

東海大學生命科學系碩士論文

探討表達微型核糖核酸 *mir-274* 對於果蠅 *wingless* 訊
息與細胞移行的作用

**Expression of *mir-274* regulates *wingless* signaling and
cell migration in *Drosophila***

研究生：張斐鈺

Fei-Yu Chang

指導教授：蔡玉真 博士

Yu-Chen Tsai, Ph.D.

中華民國一〇二年七月

東海大學生命科學系
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 張斐鈺 君所撰寫之論文
(中文)

探討微型核糖核酸 *mir-274* 對於果蠅發育的影響

(英文)

Functional study of the microRNA *mir-274* in
Drosophila development

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

陳俊奇

(簽名)

委員

孫以齡

蔣之真

中華民國 102 年 7 月 28 日

目錄

目錄	1
中文摘要	3
英文摘要	5
前言	7
微型核糖核酸的生合成及作用	7
微型核糖核酸在發育上的角色	9
<i>Wnt</i> 訊息傳遞鏈	12
<i>Wnt</i> signaling 訊息傳遞機制	13
<i>Wnt</i> signaling 在發育上的角色	14
果蠅的眼碟發育調控機制	15
研究動機與問題	17
實驗材料	18
果蠅株	18
Primer list	20
抗體	21
免疫螢光染色	23
原位末端轉移酶標定技術(TUNEL assay)	23
RNA 原位雜合實驗 (RNA <i>in situ</i> hybridization)	24
BrdU staining	27
細胞培養	27
microRNA 目標基因測試	28
小量質體製備	29

中量質體製備.....	30
掃描式電子顯微鏡.....	31
實驗結果	34
於未分化細胞表現 <i>mir-274</i> 會引起細胞凋亡.....	35
<i>mir-274</i> 廣泛表達於果蠅三齡幼蟲眼碟.....	36
於眼睛未分化細胞表現 <i>mir-274</i> 會增加 Wg 表現.....	37
表達 <i>mir-274</i> 時並不會抑制內生性 <i>upd</i> 表現且會引發細胞移行.....	38
<i>mir-274</i> 可於眼碟及翅碟中引發 Wg 表現與細胞移行現象並無組織特異性...39	39
表達 <i>mir-274</i> 時降低 <i>wg</i> 劑量可抑制細胞移行.....	40
表達 <i>mir-274</i> 時抑制細胞凋亡路徑可抑制細胞移行.....	41
<i>mir-274</i> 所引起之細胞移行現象會降低連接蛋白表現，提高表皮細胞間質化標誌蛋白.....	42
表達 <i>mir-274</i> 於眼碟與翅碟中皆會提高 <i>puc-LacZ</i> 表現.....	45
Wingless 訊息傳遞鏈的負向調控者：APC 與 Axn 可能為 <i>mir-274</i> 目標基因 .45	45
利用 TALEN 技術產生 <i>mir-274</i> 缺失果蠅株.....	47
人類 <i>mir-758</i> 可能為果蠅 <i>mir-274</i> 同源 microRNA.....	48
討論	50
<i>mir-274</i> 所導致小眼表現型可能的機制.....	50
<i>mir-274</i> 所導致細胞凋亡與細胞移行可能的機制.....	52
參考文獻	57
圖表目錄	68
圖表.....	68
附圖.....	69
個人資料表	107

中文摘要

微型核糖核酸(microRNA)是一段長約 21 到 23 個核苷酸，由生物體內自行合成的核糖核酸序列，並不會編碼出任何蛋白。microRNA 透過與信使核糖核酸(mRNA)上特定序列結合，從而抑制基因的轉譯。microRNA 在調控生物體發育與生理反應中扮演重要角色，而近年發現有些 microRNA 與癌細胞轉移有關。我利用果蠅作為模式生物來探討 microRNA 在活體中的作用。我們透過 GAL4/UAS 系統在果蠅眼睛發育早期表現 50 個 microRNAs 轉殖果蠅株，觀察果蠅眼睛發育是否有受到影響。我們篩選到 microRNA *mir-274*，其在未分化之細胞及正在分化中的視神經中表達都會使果蠅成蟲眼睛變小。透過 RNA 原位雜合法發現 *mir-274* 廣泛(ubiquitous)存在於果蠅眼碟中。在眼碟未分化之細胞表達 *mir-274* 時會降低眼睛發育正向因子 Eyeless 訊號傳遞中 Eya、Dac 蛋白表現及使 Notch 訊號傳遞中 Eyg 的表現量下降，而它會提高抑制眼睛發育之 Wingless 訊號傳遞中 Wg、Hth 的表現。將 *mir-274* 表達於眼碟邊緣及翅碟的中線時，皆觀察到 Wg 的表現量上升，並且意外發現眼碟及翅碟表皮細胞產生細胞移行(cell migration)現象。當表現 *mir-274* 同時降低 *wg* 一半劑量會抑制細胞移行。透過生物資訊研究發現在 Wingless 訊號傳遞的負向調控者：APC

與 *Axin* 的序列中預測有 *mir-274* 結合位。我的研究中顯示 *mir-274* 可提高 *wg* 表現，及引發細胞凋亡與細胞移行。*wg* 於 *mir-274* 所引發細胞凋亡與移行之中佔有重要角色。藉由我的研究可以進一步了解 *mir-274* 對於果蠅發育的影響，未來可尋找 *mir-274* 可能人類同源 microRNA 觀察是否也與細胞移行有關，而應用於臨床疾病研究上。

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are 21–23 nucleotides and short non-coding RNA molecules. MicroRNAs play an important role in posttranscriptional gene regulation. It has been demonstrated that microRNAs control mRNA decay, modification, and silencing, thereby regulating development processes and physiological control. However, the molecular mechanism of microRNAs remains obscure during developmental processes. Therefore, we used *Drosophila* eye as a model to study the function of microRNAs *in vivo*. In our lab, we utilized Gal4/UAS system to overexpress 50 microRNA transgenic lines in early eye development and then screened for alternation of adult eye size. I found that overexpression of the *mir-274* by *ey-Gal4* results in reduced eye phenotype. *mir-274* is detected ubiquitously in eye disc by RNA *in situ* hybridization. Expression of the *mir-274* induced apoptosis in the eye discs. In order to dissect the molecular mechanism in details, I examined whether *mir-274* suppresses the positive eye regulators or induces the negative eye regulators. The results revealed that *mir-274* suppressed the positive eye regulators, Dac, Eya and Eyg, and induced negative regulators, Wg and Hth. Interestingly, I found overexpression of the *mir-274* in the *dpp-Gal4* expression region of eye and wing induced cell migration phenotype. Overexpression of the *mir-274* inhibited E-cadherin and Arm, along with inducing N-cadherin, Mmp1, Rho1, Rab11 expression and actin aggregation. Reducing *wg* dosage in *dpp>mir-274* background suppressed cell migration phenotype in the eye disc and wing disc. Based on my observation and bioinformatics analysis, I

found that two negative regulators of Wnt pathway, *APC* and *Axn* contain *mir-274* target sites. In my studies, I found *mir-274* induced *wg* expression, apoptosis and cell migration. *mir-274* and *wg* have strong genetic interaction in *mir-274* inducing cell migration and apoptosis phenotypes. My studies may shed light on the function of *mir-274* on development in the future.

前言

核糖核酸干擾(RNA interference, RNAi)為一種生物體內調控基因表現的系統，其可分為兩種干擾型式：微型核糖核酸(microRNA)及小干擾核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)。兩者皆是在基因轉錄後層級做調控，干擾目標基因蛋白質表現，而達到抑制基因的效果，此又稱為基因沉默(gene silencing)。我的論文主要是利用黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)作為模式生物，研究 *mir-274* 在果蠅發育中所扮演的角色及尋找 *mir-274* 這個 microRNA 目標基因。

微型核糖核酸的生合成及作用

微型核糖核酸為一段長約21到23個核苷酸，其為內生性RNA由核內轉錄出，藉由RNA聚合酶II (RNA polymerase II)或RNA聚合酶III (RNA polymerase III)轉錄出初級微型核糖核酸(pri-miRNA)(Bushati and Cohen, 2007; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004)。pri-miRNA結構上是長莖型(stem-loop)的二級結構，在核內經過RNase III Drosha及double-stranded RNA-binding domain (dsRBD) 蛋白 DGCR8(於果蠅及線蟲中稱為Pasha (Partner of Drosha))所組成的複合蛋白切割成長約70個核苷酸並且三端有多出兩個核苷酸的髮夾狀(Hairpin)結構後，稱為次級微核糖核酸(pre-miRNA) (Denli et al., 2004; Han et al.,

2004; Lee et al., 2003; Winter et al., 2009)。*Exportin-5*可辨識pre-miRNA的三端突出區域，將pre-miRNA從核內運輸至細胞質(Bohnsack et al., 2004; Yi et al., 2003)。*Dicer*(RNase III)及*TRBP*(TAR-RNA binding protein)會構成蛋白複合物，將pre-miRNA切割至長度約21至25個核苷酸，形成一雙股miRNA：miRNA* 複合結構(duplex) 核糖核酸結構(Chendrimada et al., 2005; Hutvagner et al., 2001)。隨後*TRBP*會吸引*Argonaute Protein Ago2*，形成*Dicer/TRBP/Ago2*三聚體蛋白稱*RISC*(RNA-induced silencing complex)，藉由miRNA：miRNA*複合結構(duplex)中miRNA五端鹼基與*RISC*配對鍵結力較弱，使miRNA*通常為被降解的一股，而使miRNA形成成熟微核糖核酸(mature miRNA) (Bushati and Cohen, 2007; Du and Zamore, 2005; Gregory et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005; Schwarz et al., 2003)。成熟miRNA其五端第二至八鹼基有一長度約七至八個核苷酸長之特定區域稱核心區域(seed region)，當miRNA被*RISC*導引至目標基因的信使核糖核酸(mRNA) 三端不轉譯區(3'UTR)或是五端不轉譯區(5'UTR)上時，利用核心區域(seed region)與目標基因序列進行鹼基配對結合，使目標基因的mRNA被切割與降解，從而抑制轉錄後基因表達(Brennecke et al., 2005; Bushati and Cohen, 2007; Doench and Sharp, 2004)。

微型核糖核酸在發育上的角色

從許多模式生物如：線蟲、果蠅、斑馬魚與老鼠至人類，已有許多微型核糖核酸（microRNAs）被報告與發育相關(Wienholds and Plasterk, 2005; Zhao and Srivastava, 2007)。在斑馬魚中抑制 microRNA 成熟過程中必須的 Dicer (RNase III) 時，胚胎體軸與組織型態(pattern formation)雖不受到影響，主要細胞型態(cell types)與器官也都存在，但 Dicer 缺失的魚在長大後，器官都有嚴重型態上與功能上的缺陷，特別是腦部與心臟(Wienholds et al., 2003)。Dicer 突變小鼠在胚胎時期會死亡(Bernstein et al., 2003)。目前的研究發現不論是在活體內或細胞實驗中，都發現 Dicer 缺失的小鼠胚胎幹細胞會產生細胞分化缺陷，無法正常分化出三胚層而形成胚胎(Bernstein et al., 2003)。若只在小鼠四肢中胚層(limb mesoderm)部分區域抑制 Dicer 的表達時，會導致小鼠胚胎四肢有嚴重的生長缺陷，但基本的四肢位置表達(limb patterning)與組織特異性的分化仍正常(Harfe et al., 2005)。以上結果可顯示 microRNAs 可作為微調發育過程使器官可精準發育形成，並且對於發育早期扮演重要角色。

在細胞層級的部分，microRNAs 會調控細胞凋亡與許多訊息傳遞鏈，如：Notch 訊息傳遞鏈、EGFR 訊息傳遞鏈及 Wnt 訊息傳遞鏈等(Zhao and Srivastava, 2007)。bantam 於果蠅中被發現會調控細胞增生

與抑制細胞凋亡基因 *hid*(Brennecke et al., 2003)。而果蠅的 *mir-14*(*dme-mir-14*)為細胞凋亡的抑制者，大量表現時可抑制細胞凋亡蛋白 Reaper 與 Grim 所導致的細胞凋亡表現(Xu et al., 2003)。果蠅 *mir-8*(*dme-mir-8*)被指出會透過抑制 Wnt 訊息傳遞鏈配體 *wingless* 與其訊息鏈正向調控基因 *CG32767*，來達到抑制 Wnt 訊息傳遞鏈(Kennell et al., 2008)。而果蠅 *mir-315*(*dme-mir-315*)則是會透過抑制 Wnt 訊息傳遞鏈的負向調控者：*Axin* 與 *notum*，而提高 Wnt 訊息傳遞鏈的表現(Silver et al., 2007)。microRNAs 於組織發育層級中，小鼠 *mir-1*(*mmu-mir-1*)被報導與心臟發育有關，*mmu-mir-1-1* 與 *mmu-mir-1-2* 大量存在於正在發育的小鼠心臟(Zhao et al., 2005)。在正在發育的老鼠心臟大量表現 *mmu-mir-1* 時，會導致細胞週期提早結束與降低心室細胞增生與擴張，*mmu-mir-1-1* 會調控 bHLH 轉錄因子 Hand2 影響心室心肌細胞擴張(Zhao et al., 2005)。而與 *mmu-mir-1* 同源的果蠅 *mir-1*(*dme-mir-1*)與肌肉細胞發育有關，*dme-mir-1* 的突變會造成維持肌肉細胞的基因表現缺失而在果蠅胚胎或幼蟲時期即死亡(Kwon et al., 2005; Sokol and Ambros, 2005)。 *dme-mir-1* 被指出會調控 Notch 訊息傳遞鏈的配體 Delta，而影響果蠅心肌細胞分化(Kwon et al., 2005)。在此可知 microRNAs 會調控訊息傳遞影響生物體正常發育扮演重要角色。

近年來也開始探討 microRNAs 與癌症的關係(Hammond, 2006; Iorio and Croce, 2012; Zhang et al., 2007)。2011 年時 Dominguez 實驗室透過於果蠅眼睛大量表達 Notch 訊息傳遞鏈配體 *Delta* 與 *eyeful* 所造成的大眼與細胞轉移(metastasis)的表現型進行篩選，發現果蠅的 *mir-8*(*dme-mir-8*)可透過抑制 Notch 訊息傳遞鏈的配體 *Serrate*，來調控細胞增生與細胞凋亡(Vallejo et al., 2011)。而果蠅 *mir-8* 與人類 *mir-200* 家族(*mir-200a*、*mir-200b*、*mir-200c*、*mir-141* 與 *mir-429*)同源(Hyun et al., 2009)。先前文獻已指出人類 *mir-200* 家族會在膀胱癌、EB 病毒(Epstein-Barr virus)相關胃癌與卵巢癌中表現量下降(De Craene and Berx, 2013; Hu et al., 2009; Shinozaki et al., 2010; Wiklund et al., 2011)。於細胞實驗中，異位表達人類 *mir-200* 家族於癌細胞株中可提高鈣依賴性細胞黏附分子 E (E-cadherin)表達，抑制癌細胞移動力(Park et al., 2008)。人類 *mir-200* 家族透過抑制 E-cadherin 轉錄抑制者(transcriptional repressor)ZEB1 與 ZEB2，降低癌細胞中 E-cadherin 表現量，來調控表皮細胞間葉化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)(Burk et al., 2008; Gregory et al., 2008; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008)。果蠅中發現 *dme-mir-8* 會抑制 *Serrate*，人類 *mir-200* 家族則證實會抑制 *Serrate* 的人類同源基因 *JAGGED1*(Vallejo et al., 2011)。於高侵襲性前列腺癌細胞株實驗中，大量表現 *mir-200c* 與 *mir-141* 這兩個人類 *mir-200* 家族的 microRNAs，會降低 ZEB1 的表現

量，導致細胞 EMT(Vallejo et al., 2011)。從這些觀察，可以知道 MicroRNAs 從調控正常發育至疾病都佔有重要角色。

Wnt 訊息傳遞鏈

Wnt 訊號傳遞鏈在演化上高度保留，於脊椎動物中目前已知至少有 19 種 *Wnt* 蛋白，而於果蠅中已知有 7 種，其中果蠅 *Wingless* 與脊椎動物 *Wnt-1* 為同源蛋白(Rijsewijk et al., 1987; Wodarz and Nusse, 1998)。*Wnt* 訊號傳遞鏈作用於胚胎發育、細胞命運決定(cell fate)、細胞增生(cell proliferation)、細胞移行(cell migration)、幹細胞命運維持(stem cell maintenance)與腫瘤形成(oncogenesis)中扮演重要角色(Chien et al., 2009)。*Wnt* 得名於果蠅基因 *wingless (wg)* 與老鼠基因 *Int*(Nusse et al., 1984; Rijsewijk et al., 1987)。*Wingless(wg)* 最初於果蠅中被發現 *wg* 突變會影響胚胎體節發育(Baker, 1988; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980)。在果蠅中 *wingless* 突變將導致果蠅成蟲無翅(Wu and Cohen, 2002)。脊椎動物 *Wnt* 基因最早是發現於當小鼠受小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)感染導致腫瘤時，*Int-1 (integration-1)* 會被活化，而 *Int-1* 位於小鼠乳腺腫瘤病毒整合位點(integration sites)附近(Nusse et al., 1984)。在受小鼠乳腺腫瘤病毒感染之腫瘤中發現，病毒在複製並整合入基因體後可導致一種或多種 *Wnt* 基因合成增加(Nusse

et al., 1990)。

Wnt signaling 訊息傳遞機制

Wnt 訊號傳遞鏈傳遞機制以是否透過 β -catenin 活化下游基因而分為兩種：典型 *Wnt* 訊號傳遞鏈(*Wnt*/ β -catenin pathway)與非典型 *Wnt* 訊號傳遞鏈 (β -catenin-independent *Wnt* pathway)。非典型 *Wnt* 訊號傳遞鏈目前可分為兩種：*Wnt*/planar cell polarity pathway 與 *Wnt*/calcium pathway (Axelrod et al., 1998; Boutros et al., 1998; Kohn and Moon, 2005)。

典型 *Wnt* 訊號傳遞鏈(*Wnt*/ β -catenin pathway)當配體(ligand) *Wnt* 蛋白與受體 (receptor)Frizzled(Fzd) 家族蛋白結合後，Dishevelled(Dsh/Dvl)蛋白接受到 *Wnt* 訊號，使細胞質內的 β -catenin 不受到 GSK3(glycogen synthase Kinase 3)、APC(adenomatous polyposis coli)、Axin、PP2A(protein phosphatase 2A)及 CK1 α (casein kinase 1 α)所形成的蛋白複合物泛素化(ubiquitination)而送至蛋白酶體(proteasome)降解，而使細胞質內的 β -catenin 累積足夠量， β -catenin 會移動入核成為轉錄調控者(transcriptional regulator)與轉錄因子(如：LEF/TCF 轉錄因子)結合，進而啟動下游基因表達。在沒有收到 *Wnt* 訊號時，細胞質中的 β -catenin 會因被 GSK3/APC/Axin/PP2A/CK1 α 所

形成之複合物磷酸化而被降解，因此細胞質中 β -catenin 的濃度較低而無法啟動 Wnt 訊息鏈下游基因(Chien et al., 2009; Polakis, 2012)。且 Wnt 訊息傳遞鏈中的許多分子被發現本身即是 Wnt 訊息鏈的下游基因，藉此可作為回饋調控 Wnt 訊息傳遞鏈(Logan and Nusse, 2004; Manoukian et al., 1995; Yoffe et al., 1995)。

非典型 Wnt 訊號傳遞鏈中，Wnt/planar cell polarity pathway，會透過 Dsh 活化 JNK 訊息傳遞鏈，調控果蠅眼睛平面細胞極性(planar cell polarity)(Boutros et al., 1998)。Wnt/calcium pathway，則發現在一些情況下 Wnt 訊息上升時會使鈣離子上升，進而活化 protein kinase C (PKC)(Chien et al., 2009)。其他非典型 Wnt 訊號傳遞鏈，在老鼠與斑馬魚等模式生物及細胞實驗中，被推測可能與調控細胞移動(cell motility)或細胞貼附(cell adhesion)有關(Chien et al., 2009)。

Wnt signaling 在發育上的角色

Wnt 蛋白為分泌性蛋白，並且為型態生成素(Morphogen)(Zecca et al., 1996)。於果蠅中，*wg* 早期調控胚胎前後端體軸發育(Baker, 1988; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980)，在幼蟲時期參與決定幼蟲表皮分區(Bejsovec and Martinez Arias, 1991)。*wg* 對於果蠅翅膀發育十分重要，*wg* 於翅膀發育上扮演兩種角色。在果蠅二齡幼蟲時期 *wg* 表達於

翅碟前端，決定翅膀原基(wing primordium)，為未來發育成翅膀之部位(Wu and Cohen, 2002)。在三齡幼蟲時期 *wg* 於翅碟的背腹面交界(DV boundary)表達，決定翅膀的背腹軸(Neumann and Cohen, 1997)。*wg* 於果蠅早期眼碟發育會促進背側(dorsal)眼碟細胞增生(Chang et al., 2001; Cho et al., 2000)，但於三齡幼蟲時期當視神經開始分化時，*wg* 表達則會抑制視神經細胞分化(Ma and Moses, 1995; Treisman and Rubin, 1995)。*wg* 於眼睛發育早期為決定眼碟細胞為背側細胞基因，而在視神經開始發育後則為眼睛發育負向調控者。

Wnt 訊息傳遞鏈除了在發育上重要外，目前也有許多文獻指出它與疾病的關聯。典型 Wnt 訊息傳遞鏈影響多種癌症(如：肝癌、卵巢癌與大腸癌)，其中以大腸癌與 Wnt 訊息傳遞鏈最為密切，目前文獻指出 Wnt 訊息傳遞鏈負向調控者 *APC* 與 *CTNGB1*(cadherin-associated protein beta-1)突變時，會提高大腸癌罹病率(Klaus and Birchmeier, 2008; Polakis, 2012)。

果蠅的眼碟發育調控機制

果蠅成蟲眼睛是由一盤狀組織稱為眼碟(eye imaginal disc)所發育而成。在果蠅眼睛發育過程中需有許多訊號傳遞參與，它們藉由影響細胞數目與調控視神經分化過程進而控制眼睛發育(Kumar, 2001; Singh et al., 2012)。果蠅眼睛發育早期，眼碟細胞會進行增生，目前

已知主要透過 Notch 訊息傳遞鏈下游基因 *eyegone (eyg)* 將訊息傳遞給 Jak/STAT 訊息傳遞鏈配體 *unpaired (upd)* 活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈使眼碟細胞增生 (Chao et al., 2004; Tsai and Sun, 2004)。而 *upd* 也會透過抑制眼睛發育的負向調控者 *wingless(wg)*，促進正向調控者 *decapentaplegic(dpp)* 的表現來調控眼睛發育 (Ekas et al., 2006; Tsai et al., 2007)。於果蠅三齡幼蟲時期，眼碟後端會啟動一凹溝 (morphogenetic furrow, MF) 並往前端移動，位於 MF 前端為未分化細胞，而 MF 後的細胞未來有一部分將分化成為視神經細胞 (Bate and Martinez Arias, 1993; Ready et al., 1976)。MF 啟動代表視神經細胞開始分化。早期三齡幼蟲眼碟 *hedgehog(hh)* 與 *decapentaplegic(dpp)* 表現於眼碟後端，正向調控 MF 的啟動 (Chanut and Heberlein, 1997; Ma et al., 1993)。MF 啟動後 *hh* 會進一步活化 *dpp*，使 MF 從眼碟後端移動至前端 (Borod and Heberlein, 1998; Chanut and Heberlein, 1997)。*wingless(wg)* 於果蠅三齡幼蟲眼碟中扮演負向調控者，*wg* 表現於果蠅眼碟邊緣兩側 (Baker, 1988)，且會抑制 MF 啟動而抑制視神經細胞發育 (Ma and Moses, 1995; Treisman and Rubin, 1995)。目前已知 *wg* 與 *dpp* 會互相抑制對方表現，使 MF 可自眼碟後端往前平行移動至前端 (Theisen et al., 1996)。

研究動機與問題

MicroRNA 已知在發育與疾病上面扮演重要角色。因此我以果蠅眼睛作為平台，利用 Gal4-UAS 系統(Brand and Perrimon, 1993)，於果蠅眼睛大量表達 microRNA 觀察成蟲眼睛大小與外表型的改變。發現 *mir-274* 於眼睛未分化細胞(*ey>mir-274*)表達時會造成小眼表現型。*mir-274* 是一個在發育方面尚未被清楚研究的 MicroRNA，在我的研究中，我想了解 *mir-274* 於眼睛及翅膀發育上面所扮演的角色以及它的目標基因為何。我利用 RNA 原位雜交法，發現 *mir-274* 會廣泛表達於果蠅三齡幼蟲眼碟中。表現 *mir-274* 時會導致小眼表現型，為了解 *mir-274* 是否影響細胞凋亡或細胞增生而影響到眼睛發育，利用組織免疫螢光染色來偵測，發現 *mir-274* 表達時會導致細胞凋亡。*mir-274* 引發小眼表現型可能透過影響眼睛發育訊息傳遞分子，因此我利用組織免疫螢光染色來偵測，*mir-274* 表達時會提高眼睛發育負向調控因子 *wg* 表現。表達 *mir-274* 於眼碟中意外發現會導致細胞移行。藉由遺傳交互作用(genetic interaction)降低 *wg* 劑量與抑制細胞凋亡皆可抑制 *mir-274* 所導致細胞移行表現型。利用生物資訊研究發現 Wingless 訊號傳遞的負向調控者：*APC* 與 *Axin*，它們的序列中預測有 *mir-274* 結合位，可能為 *mir-274* 目標基因。我利用冷光酵素活性測定(luciferase assay)，來測試 *APC* 與 *Axin* 是否為 *mir-274* 真正目標基因。

實驗材料

果蠅株

<i>w</i> ¹¹¹⁸	From Bloomington Stock Center
<i>w;TM3,Sb/TM6B</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w;Sp/CyO;Dr/TM6B</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w;DH/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w;ey-Gal4</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w;GMR-Gal4</i>	
<i>dpp</i> ^{c40.1} - <i>Gal4</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>ap-Gal4</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>wg-Gal4</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>omb-Gal4/FM7a;UAS-GFP</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>ywFLP;Ay-Gal4,UAS-LacZ/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>wg-LacZ/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>wg</i> ^{CX4} / <i>S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>dpp-Gal4,UAS-GFP/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>upd-LacZ;dpp-Gal4;UAS-GFP/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>dpp-Gal4;dpp-LacZ/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>UAS-dsRed; dpp</i> ^{c40.1} - <i>Gal4/TM6B</i>	In this study
<i>10X STAT GFP NLS;ey-Gal4/S-T</i>	From our lab
<i>10X STAT GFP NLS;dpp</i> ^{c40.1} - <i>Gal4/S-T</i>	In this study
<i>UAS-mir-274/TM3</i>	From Dr. Chun-Hong Chen

UAS- <i>mir-274</i> /CyO	From Dr. Chun-Hong Chen
<i>w</i> ;UAS- <i>mir-274</i> /CyO; <i>Dr/TM6B</i>	In this study
<i>w</i> ;Sp/CyO;UAS- <i>mir-274/TM6B</i>	In this study
UAS-GFP;UAS- <i>mir-274/S-T</i>	In this study
UAS- <i>dsRed</i> ;UAS- <i>mir-274/TM6B</i>	In this study
<i>ywFLP</i> ;UAS- <i>mir-274/S-T</i>	In this study
<i>wg-LacZ</i> ;UAS- <i>mir-274/S-T</i>	In this study
<i>wg^{spd-flg}</i> ;dpp- <i>Gal4/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>wg^{CX4}</i> ;UAS- <i>mir-274/S-T</i>	In this study
Sp/CyO;UAS- <i>p35</i>	From Dr. Y. Henry Sun
Sp/CyO;UAS- <i>Diap1</i>	From Dr. Y. Henry Sun
UAS- <i>miRGH</i>	From Dr. Chun-Hong Chen
UAS- <i>mir-274</i> ;UAS- <i>p35/S-T</i>	In this study
UAS- <i>mir-274</i> ;UAS- <i>Diap1/S-T</i>	In this study
UAS- <i>miRGH</i> ;UAS- <i>mir-274/S-T</i>	In this study
UAS - <i>cycE</i>	From Dr. Y. Henry Sun
UAS- <i>mir-274</i> ;UAS- <i>cycE/S-T</i>	In this study
UAS- <i>mir-274</i> ;puc ^{E69} /S-T	In this study
P{EPgy2}Axn ^{EY10228}	From Bloomington Stock Center #17649
UAS- <i>mir-274</i> ; P{EPgy2}Axn ^{EY10228} /S-T	In this study
Axn <i>dsRNA</i>	From VDRC #v7748
UAS- <i>mir-274</i> ; Axn <i>dsRNA</i> /S-T	In this study

Primer list

Construct	Primer	Sequence of primer	Tm(°C)
Tubulin- <i>mir-274</i>	<i>mir-274-1F</i>	Not I EcoR I A GCGGCCGC GAATTC GAAACTGTGA TTAAGAGCCG	46.7
	<i>mir-274-2R</i>	Xho I EcoR I A CTCGAG GAATTC TTCATTTCTGACG ACCTATTC	46.1
Luciferase- <i>Axn</i> 3'UTR	<i>Axn-1F</i>	Xho I A CTCGAG CGACATACTGCCGCTATTTCG GAGAC	61.8
	<i>Axn-2R</i>	Xho I A CTCGAG ACCTCGTCCGTTCCGGCCA AG	63.9
Luciferase- <i>APC</i> 3'UTR	<i>APC-1F</i>	Xho I A CTCGAG CGCAGCTCCACGTTTGACA ATA	57.9
	<i>APC-2R-2</i>	Xho I A CTCGAG AGTCGCAAATGATGAGCTT AATGC	56.5
Luciferase- <i>Axn</i> 3'UTR mutant-1	<i>Axn mut-1-1F</i>	Mutant seed region GGCTTTTGTAAGCAT TATACA CTA CTCT CTGCGGGGG	68.3
	<i>Axn mut-1-2R</i>	Mutant seed region CGCAGAGAGTAG TGTATA ATGCTTACA AAAGCCGGT	67.4
Luciferase- <i>Axn</i> 3'UTR mutant-2	<i>Axn mut-2-1F</i>	Mutant seed region CTTTAGGAACTACTG TATACA ATCACAT TATTAGGAA	58.2
	<i>Axn mut-2-2R</i>	Mutant seed region TTCCTAATAATGTGAT TGTATA CAGTAG TTCCTAAAG	58.2
Luciferase- <i>APC</i> 3'UTR mutant	<i>APC mut-1F</i>	Mutant seed region CAGGATAGTATGGAT TATACA TTAGCCA AGTTAAAG	59.7

Luciferase-APC 3'UTR mutant	APC mut-2R	Mutant seed region CTTTAACTTGGCTAAATGTATAATCCATA CTATCCTG	59.7
	TALEN-274 -1F	CTCGTGATTCCCTGATCCGCACATCTA	62.1
	TALEN-274 -2R	TGAATCTTTGTCTCGATAAATGCATC	55.6

抗體

Antibody	Host	Titer	Source
Anti-BrdU	mouse	1:20	BD: 347580
Cleaved Caspase-3	Rabbit	1:200	Cell signaling:1050
Phospho-Histone H3	Rabbit	1:500	Upstate:06-570
eyg	Guinea Pig	1:1000	Dr. Y. Henry Sun
Elav(7E8A10)	Rat	1:400	Developmental Studies Hybridoma Bank
Wingless(4D4)	Mouse	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
Hth	Rabbit	1:200	Dr. Y. Henry Sun
Arm (N27A1)	Mouse	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
E-cadherin	Rat	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
MMP1 (14A3D2)	Mouse	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
MMP1 (5H7B11)	Mouse	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank

MMP1 (3B8D12)	Mouse	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
MMP1 (3A6B4)	Mouse	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
N-cadherin	Rat	1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank
Rho1 (p1D9)	Mouse	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank
β -galactosidase	Rabbit	1:1000	Developmental Studies Hybridoma Bank

實驗方法

免疫螢光染色

解剖盤內加入 1ml 的 1XPBS(137mM NaCl, 2.68mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ · 2H₂O, 1.76mM KH₂PO₄)緩衝液，接著於解剖顯微鏡下將果蠅三齡幼蟲欲染色觀察之眼碟或翅碟取出，放置於 4% paraformaldehyde/PBS 室溫固定二十分鐘，固定後再使用 1XPBST(137mM NaCl, 2.68mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ · 2H₂O, 1.76mM KH₂PO₄, 0.3% Triton X-100)清洗三次。加入一級抗體及 10% NGS(Normal Goat serum)於組織中，放置於 4°C 染色至隔夜或室溫兩小時。以 1XPBST(0.3% Triton X-100)清洗三次，加入以螢光標記之二級抗體染色，避光置於室溫一小時，以 1XPBST 清洗三次。取出樣本，使用 DABCO (1X PBS, 0.22M N-propyl gallate, 90% glycerol) 封片。

原位末端轉移酶標定技術(TUNEL assay)

解剖盤內加入 1 ml 的 1XPBS 緩衝液，接著於解剖顯微鏡下將果蠅三齡幼蟲欲染色觀察之眼碟或翅碟取出，放置於 4% paraformaldehyde/PBS 室溫固定二十分鐘，固定後再使用 1XPBST(0.3% Triton X-100)清洗三次。將樣本置於 10 µg/ml Proteinase K 室溫反應九分鐘，以 1XPBST 清洗三次，再用 4% paraformaldehyde/PBS 固定二十分鐘後，用 1XPBST 清洗兩次。

將樣本放入 ApoAlert™ DNA Fragmentation Assay Kit (Clontech) equilibration buffer 中，置於室溫反應十分鐘。將樣本換至 TUNEL cocktail(內有 equilibration buffer、Nucleotides Mix 及 TdT Enzyme)中，避光置於 37°C 反應一小時，然後加入 2X SSC 置於室溫十五分鐘停止反應。用 1XPBST 清洗兩次，取出樣本，使用 DABCO 封片。

RNA 原位雜合實驗 (RNA *in situ* hybridization)

核糖核酸探針(RNA probe)製作

以 *pBluescript KS-mir-274* 質體作為模板，先將質體以限制酶切割成線性，取 3 μ g 質體 DNA，分別與不同限制酵素(*Not I* 和 *EcoR I*) 進行限制酵素切割，於 37°C 反應至隔夜。反應結束跑 DNA 電泳確認有完全切割。將質體 DNA 酒精沉澱後溶於 6 μ l TE，取出 1 μ g 質體，分別與 DTT 還原劑(10 mM)、2 μ l NTP labeling mixture (1mM ATP, 1mM CTP, 1mM GTP, 0.65mM UTP, 0.35mM Dig-UTP)、1 μ l RNase 抑制劑、轉錄緩衝液(1X) 與 9 μ l ddH₂O，並分別加入 2 μ l 不同的 RNA 聚合酶 (sense:T3, anti-sense:T7)，進行體外轉錄反應(*in vitro* transcription)，於 37°C 反應兩小時。反應結束後分別加入 2 μ l 0.2M EDTA 和 1 μ l DNase I，於 37°C 反應 15 分鐘，使聚合酶停止反應並清除剩餘 DNA。接著加入 2.5 μ l 4M LiCl 和 75 μ l 預冷後 100%酒精，於 -20°C 反應 2 小

時。以 4°C 轉速 13000rpm 離心 15 分鐘後，除去上清液，加入 50 μ l 75% 預冷酒精再以 4°C 轉速 13000rpm 離心 5 分鐘。於 42°C 烘乾後加入 100 μ l Hybridization buffer 回溶分裝使用，並取少量跑膠確認探針品質。

眼碟原位雜合反應

原位雜合實驗所使用之藥品，皆須使用滅菌過之 0.1% DEPC 水配置。樣本取樣前所使用之玻璃盤須以 0.1% H₂O₂ 浸泡十分鐘，以防止 RNAase 污染。解剖盤內加入一毫升的 1XPBS 緩衝液，接著於解剖顯微鏡下將果蠅三齡幼蟲欲染色觀察之眼碟或翅碟取出，前固定於 4% formaldehyde/PBS 室溫固定二十分鐘，之後置換於 4% formaldehyde/PBST(0.6% TritonX-100) 於室溫固定二十分鐘，用 1XPBST(0.3% Triton X-100)清洗三次。清洗後將樣本於室溫依序置換 25% 酒精、50% 酒精及 75% 酒精各置換一次，100% 酒精置換兩次。最後將樣本放置於 -20°C 至隔夜，以降低背景值。

於室溫中將樣本依序由 100% 酒精、75% 酒精、50% 酒精、25% 酒精置換至 1X PTw (0.1% Tween 20) 中。置換完加入 10 μ g/ml Proteinase K 組織水解反應九分鐘，用 2mg/ml glycine 清洗樣本兩次以停止反應，再使用 1X PTw 清洗樣本兩次。以 4% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde/PTw 於室溫固定二十分鐘，固定完以 1X PTw 於室

溫清洗四次。將樣本以 PTw : Hybridization buffer=1 : 1 做置換，接下來以 Hybridization buffer 置換兩次，使樣本完全置換於 Hybridization buffer 中。之後加入 100 μ g/ml Salmon sperm DNA 及 100 μ g/ml tRNA (以 80 $^{\circ}$ C 加熱十分鐘，隨後置於冰上備用。)，放入 65 $^{\circ}$ C 反應一小時。除去上清液，加入 95 μ l Hybridization buffer (內有 100 μ g/ml Salmon sperm DNA 及 100 μ g/ml tRNA) 及 5 μ l RNA probe (RNA probe 以 80 $^{\circ}$ C 加熱十分鐘，隨後置於冰上備用。) 放入 65 $^{\circ}$ C 水浴槽反應 48 小時。

呈色反應

樣本以 Hybridization buffer 於 65 $^{\circ}$ C 清洗三次，每次二十分鐘。再於室溫清洗兩次，每次二十分鐘。以 Hybridization buffer : PTw =1 : 1 做置換，最後以 1X PTw 置換五次，每次二十分鐘，將樣本完全置換於 1X PTw 中。加入 anti-Dig-AP (1:2000) 4 $^{\circ}$ C 放置隔夜或室溫兩小時，隨後以 1X PTw 於室溫清洗四次，每次二十分鐘。加入 Levamisole solution(100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris pH=9.5, 1mM Levamisole, 0.1% Tween 20)清洗三次，每次五分鐘，以抑制內生性磷酸酶活性。最後將樣本放入呈色劑(含 4.5 μ l NBT 和 3.5 μ l BCIP 的 Levamisole solution)中，於室溫避光反應。待樣本呈色結束後，以 PTw 清洗五次，每次十分鐘。取出樣本，使用 DABCO (1X PBS, 0.22M N-propyl gallate) 封片。

BrdU staining

解剖盤內加入 1 ml 的預冷過的 Schneider 培養液，接著於解剖顯微鏡下將果蠅三齡幼蟲欲染色觀察之眼碟取出。將樣本移至含有 60 $\mu\text{g/ml}$ BrdU 的 Schneider 培養液中，於室溫反應 45 分鐘，反應結束後以 Schneider 培養液(不含 BrdU)清洗五分鐘。再以 1XPBS 清洗兩次，每次五分鐘。以 PLP 溶液(3.7% paraformaldehyde, 0.01M NaIO_4 , 75mM Lysine)於室溫固定樣品 20 分鐘，隨後以 1XPBS 清洗三次，每次五分鐘。將樣品換至 500 μl 1XPBS/0.6% TritonX-100 中，反應五分鐘，使組織破損讓抗體可進入組織。再加入 500 μl 4N HCl/1XPBS，反應 30 分鐘，使染色體鬆開，讓抗體可結合上去。以 1XPBST(0.3% TritonX-100)清洗兩次，每次五分鐘。加入 anti-BrdU 抗體(1:20)及 0.2% BSA 於組織中，放置於 4°C 染色至隔夜。以 1XPBST(0.3% Triton X-100)清洗四次，每次 15 分鐘。加入以螢光標記之二級抗體染色，避光置於室溫二小時，以用 1XPBST 清洗三次。取出樣本，使用 DABCO 封片。

細胞培養

果蠅 S2 細胞株以 *Drosophila* Schneider's Medium (GIBCO)外加 10% 胎牛血清(Fetal Bovine Serum/FBS)與 1% Penicillin-Streptomycin

培養於 T25 在培養瓶中，放置於 25°C 培養箱中 3-4 天，之後以 1:4 稀釋倍率繼代培養。

microRNA 目標基因測試

細胞轉染

果蠅 S2 細胞株 培養於含 10% FBS 與 1% Penicillin-Streptomycin 的 Schneider's Medium (GIBCO) 的 T25 培養瓶中，放置 25°C 培養箱 3-4 天。將細胞打散後吸取至 15 ml 離心管中，以 1000 rpm 離心 5 分鐘。除去上清液並拍散細胞，加入 Schneider's Medium(不含 FBS)，再以 1000 rpm 離心 5 分鐘，重複此步驟兩次。除去上清液，之後補入 Schneider's Medium(不含 FBS)，計算細胞數，以每格 2×10^6 個 S2 cell 取至六孔培養盤。每格準備 1.2 μ g 的質體 DNA(1 μ g Tub-microRNA 質體、0.1 μ g Tub-firefly luciferase-目標基因 3'UTR 質體與 0.1 μ g Renilla luciferase(Stark et al., 2005))，混合於 100 μ l 培養液(不含 FBS)混合均勻；另一部分，準備和質體 DNA 重量比例為 1:4 的 cellfectin[®] Reagent(Invitrogen:1 μ g/ml)混合於 100 μ l 培養液(不含 FBS)混合均勻，靜置 15 分鐘後再與含質體 DNA 之培養液混合。將含質體 DNA 培養液與含 cellfectin 培養液緩慢混合均勻，靜置 20 分鐘。之後將質體 DNA/cellfectin 混合培養液轉染(transfect)至 S2 細胞中，每格最後以

培養液(不含FBS)補 1 ml。於 25°C 培養箱轉染 4-6 小時後除去培養液，換置成含有 FBS 之培養液，一格 3 ml。最後培養於 25°C 培養箱 48 小時後，取出細胞以 4°C、1000 rpm 離心 5 分鐘。除去上清液，加入 1XPBS 再以 4°C、1000 rpm 離心 5 分鐘，重複兩次。除去上清液，加入 Dual™-Luciferase Reporter assay System (Promega) 中的 1X Passive Lysis Buffer (PLB) 500 µl 混和均勻，於室溫反應 15 分鐘。反應完畢以 4°C、13000 rpm 離心 10 分鐘，收取上清液作冷光酵素活性測試。

冷光酵素活性測定

使用 Dual-Luciferase Reporter assay System (Promega)，以 GloMax®-20/20 Single-Tube Luminometer 測量。取 20 µl 樣品液先與 100 µl Luciferase assay reagent II (LAR II) 混和均勻，測量出 firefly Luciferase 量，再加入 100 µl L Stop & Glo buffer，量出 Renilla luciferase 量。儀器會計算出 firefly Luciferase/ Renilla luciferase 比值，以此比值作統計分析。

小量質體製備

以 2 ml 含有 50 mg/ml Ampicillin 的 TB 培養帶有質體的大腸桿菌 XL-1 Blue 於 37°C、180 rpm 的培養箱中 14-18 小時，將菌液震盪均勻後取 1 ml 至離心管中，以轉速 13200 rpm 離心 30 秒將細菌沉澱下

來。除去上清液，加入 100 μ l Solution I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH=8.0, 10mM EDTA pH=8.0)於細菌中且震盪均勻，接著加入 200 μ l Solution II (0.2N NaOH, 1%SDS)緩慢旋轉混合至均勻，再加入 150 μ l Solution III(0.3M CH₃COOK (KOAc) pH=5.2, 1.5% CH₃COOH(HOAc))緩慢旋轉混合均勻，最後加入 100 μ l Chloform 與 Isoamyl alcohol (24:1) 混合液混合均勻後，以轉速 13200 rpm 離心 15 分鐘。離心後有機層與水層分離，將水層部分吸起 450 μ l 至新離心管，加入 900 μ l 100% EtOH 混合均勻放入-20 $^{\circ}$ C 5 分鐘以上使質體 DNA 沉澱，以轉速 13200 rpm 離心 15 分鐘。除去上清液，此沉澱物為質體 DNA 與 RNA 混合物，再加入 900 μ l 70% EtOH 清洗質體 DNA 與 RNA 混合物，以轉速 13200 rpm 離心 5 分鐘。除去上清液，以 42 $^{\circ}$ C 乾燥質體 DNA 與 RNA 混合物，乾燥後以 40 μ l TE(10mM Tris-HCl pH=8.0, 1mM EDTA pH=8.0)回溶質體 DNA 與 RNA 混合物，最後加入 2 μ l 10 mg/ml RNase 除去 RNA，得到質體 DNA。

中量質體製備

以 50 ml 含有 50 mg/ml Ampicillin 的 LB 培養帶有質體的大腸桿菌 XL-1 blue 於 37 $^{\circ}$ C、180 rpm 培養箱中 12-14 小時。將菌液以轉速 6000g 離心 10 分鐘沉澱下來，除去上清液。使用 Viogen midi kit，以 4 ml VP1 回溶細菌。加入 4 ml VP2 緩慢混合均勻，置於室溫 5 分鐘。

再加入 4 ml VP3 緩慢混合均勻，置於冰上 15 分鐘，以 4°C、13200 rpm 離心 15 分鐘。製備 Midi-Ultraflow 管柱，加入 3 ml 100% EtOH 至 Midi-V100™ 管柱以活化管柱，除去下清液，再加入 5 ml VPN 於管柱中備用。離心過後取上清液至製備好的管柱中，使質體與管柱上濾膜結合。加入 15 ml VPN 清洗管柱，除去下清液，加入 5 ml VPE 至管柱洗提(elute)出質體，將洗提液加入 3.5 ml 異丙醇混合均勻以沉澱質體，放置於冰上 10 分鐘後，以 4°C、13200 rpm 離心 30 分鐘沉澱 DNA。以 1ml 70%EtOH 將所沉澱質體沖下，清洗所含之鹽類，重複三次。待水分蒸發，用 1X TE 回溶質體，存放於 4°C。

掃描式電子顯微鏡

樣本製備與臨界點乾燥

將果蠅收至樣品瓶中，利用不同濃度之酒精將樣本置換置 100% 丙酮，以進行臨界點乾燥。樣本依序以 50%酒精十分鐘與 75%酒精於室溫置換 10 分鐘二次，樣本可長期 4°C 保存於 75%酒精中。再以 80%酒精、95%酒精、兩次 100%酒精、100%酒精比 100%丙酮(1:1)、100%酒精比 100%丙酮(1:2)，每次於室溫搖晃 10 分鐘進行置換。最後以 100%丙酮置換兩次，每次於室溫搖晃 15 分鐘，最後使果蠅完全置換於丙酮中。

啟動臨界點乾燥機電源，放入刻度棒，將溫度調整至 0°C，使樣品室(Chamber)冷卻。等溫度達到進行暖機，打開 Inlet 使二氧化碳注入樣品室(約刻度棒 50% 刻度處)，靜置五分鐘，時間到達後打開 Exhaust 排氣完成暖機。打開樣品室迅速放入樣品籃，關閉樣品室後開始注氣，緩慢打開 Inlet 將二氧化碳注入樣品室中(約 55-60% 刻度棒高度)，靜置 10 分鐘後打開 Exhaust 排氣，重複三次。接著將二氧化碳注至 70% 刻度棒高度，將溫度調至 20°C，等溫度到達後靜置 15 分鐘。再將溫度調至 37°C，等溫度到達後靜置 10 分鐘。打開流量計洩氣閥(Leak Valve)以 2L/分鐘之速度排氣，排氣完畢直至壓力降為零後將溫度調回 25°C，待溫度到達後取出樣品，樣品接著進行金屬鍍膜。

金屬離子鍍膜

首先打開金屬離子鍍膜機(Ion Coater)電源，接著打開抽氣幫浦電源，最後打開 LPG valve，使樣品室開始抽真空。檢視樣品室真空度：先將 H.V control 轉至 5，然後按 Flash 鈕，同時檢視 Ion current 是否在 2mA 或以下，若達此標準，再將 H.V control 轉至 10，按 Flash 鈕，此時若 Ion current 應在 7mA 或 7mA 以下，若達此標準則可開始鍍膜。確認真空度完畢後，打開 Leak valve 以破除樣品室真空，可將欲金屬鍍膜之樣本置入樣品室中。重新抽真空，如同前面敘述檢測真空度，

若達真空度後則開始鍍膜。將H.V control 調至 8 位置，時間設定一分半鐘，此時 Ion current 約在 7mA 左右，樣品室中可見藍紫色光則已開始鍍膜（鍍膜過程中 Ion current 隨時控制在 7mA 左右）。時間到達後等待三分鐘後，再鍍膜一分半鐘，樣品則完成鍍膜。

掃描式電子顯微鏡觀察

樣品以掃描式電子顯微鏡(SEM) (Scanning Electron Microscopy, Hitachi S2300)觀察，以數位影像擷取系統(Digital Image Acquisition, GW Electronic, Norcross, GA)截取樣品影像。

實驗結果

微型核糖核酸(microRNA)是一段長約 21 到 23 個核苷酸，由生物體內自行合成的核糖核酸序列，並不編碼出任何蛋白(Winter et al., 2009)。microRNA 抑制目標基因的轉譯(Bushati and Cohen, 2007; Winter et al., 2009)。生物體於發育過程中，需要許多訊號傳遞路徑共同調控，microRNA 在調控基因表達、細胞週期、生物體發育方面扮演重要角色。於我的論文中利用果蠅當作模式生物探討 microRNA 對於發育的影響。我們首先利用 Gal4-UAS 系統(Brand and Perrimon, 1993)，將 50 個 UAS-microRNA 轉殖果蠅株(包含 25 個 microRNA)(鄭夙玢、藍婉瑜論文；表一)，分別以 *ey-Gal4* 表現於眼睛未分化細胞或 *GMR-Gal4* 表現於正在分化之神經細胞，將 microRNA 大量表達於果蠅眼碟中，觀察其果蠅成蟲眼睛大小是否改變及小眼是否有粗糙表現型。

從 50 株果蠅我們篩選出 14 株果蠅(共 8 個 microRNAs)成蟲眼睛有變小表現型(表二)，而其中 microRNA *mir-274* 不論表達於眼睛未分化細胞(*ey>mir-274*)或正在分化神經細胞(*GMR>mir-274*)中皆發現其成蟲眼睛明顯變小之表現型(圖一 B-C)。*mir-274* 這個目前在發育上作用了解較少的 microRNA，我的論文主要在果蠅複眼及翅膀中探討

mir-274 在發育上功能及 *mir-274* 在活體中誘使表皮細胞產生遷移可能的機制。

於未分化細胞表現 *mir-274* 會引起細胞凋亡

果蠅成蟲眼睛可以維持一致的大小與型態，調控眼睛發育之正向與負向訊號傳遞鏈的交互作用，以及正確的時間點誘發細胞增生與細胞凋亡，扮演重要的角色。表達 *mir-274* 時其成蟲有小眼之表現型(圖一 B-B'')，因此推測 *mir-274* 表達時可能會引發細胞凋亡或是影響細胞增生，而導致成蟲眼睛變小。眼碟未分化之細胞表達 *mir-274* (*ey>mir-274*)，透過原位末端轉移酶標定技術(TUNEL assay)與組織免疫染色偵測活化型細胞凋亡蛋白 3 (activated -caspase 3)，發現三齡幼蟲眼碟中 *mir-274* 會引起細胞凋亡(圖三 C, F)。為了解 *mir-274* 引起的細胞凋亡是否是 *mir-274* 造成小眼主要的原因，我藉由抑制細胞凋亡路徑來觀察是否可恢復 *mir-274* 所導致小眼表現型(圖一 B-B'')?在 *ey>mir-274* 果蠅中，同時利用 microRNA 剔除 *reaper*、*hid* 與 *grim* (miRGH)或是同時表達細胞凋亡路徑中最重要負向調控者 *Diap1* 抑制細胞凋亡路徑，眼碟中細胞凋亡訊號減少甚至消失(圖三 D, E, G, H)，但皆無法恢復眼碟及成蟲眼睛大小(圖三 D, E, G, H，圖二 A-B'')。

此外為了解 *mir-274* 所導致小眼表現型是否是因為 *mir-274* 抑制細胞增生，我透過 BrdU 染色與組織免疫染色偵測磷酸化組蛋白 H3

(Phospho-Histone H3)，分別偵測眼碟中 DNA 合成期細胞(S phase)與細胞分裂期的細胞(M phase)，我的結果發現 *ey>mir-274* 於三齡幼蟲眼碟時會影響細胞增生(圖四 C, E)。然而在 *ey>mir-274* 果蠅的眼中同時大量表現細胞週期蛋白 Cyclin E(*cycE*)僅可少部分恢復眼碟與成蟲眼睛大小(圖四 D, F, data not shown)。由我的結果發現，表達 *mir-274* 所導致小眼表現型的主要原因並非引起細胞凋亡或抑制細胞增生所致，可能因為 *mir-274* 影響調控眼睛發育訊息傳遞鏈之故。

mir-274 廣泛表達於果蠅三齡幼蟲眼碟

大量表達 *mir-274* 會造成眼睛變小，我想了解 *mir-274* 是否在眼睛發育時期表現，進而影響眼睛發育。我透過 RNA 原位雜合法(RNA *in situ* hybridization)來偵測果蠅三齡幼蟲眼碟中內生性的 *mir-274*，以及 *mir-274* 表現的位置。我先將包含 *mir-274* 基因組 DNA(genomic DNA)770bp 片段轉殖到 *KS⁺* 質體中，利用 T7 及 T3 RNA 聚合酶，進行體外轉錄反應(*in vitro* transcription)，以 DIG-UTP 標示 RNA，製作 *mir-274* 正向探針(sense RNA probe)與 *mir-274* 反向探針(anti-sense probe)(附圖一)。若 *mir-274* mRNA 在果蠅眼碟發育時期表現，則會與 *mir-274* 反向探針雜合並透過呈色於眼碟中被偵測到，藉由此方法可觀察 *mir-274* 在眼碟中的表現與表現區域。為了測試 *mir-274* 反向探針是否具有專一性，利用 *GMR-Gal4* 於眼睛大量表達 *mir-274*，再以

反向探針偵測 *mir-274*，確認反向探針具有高度特異性(圖五 A)。接著利用此組探針來偵測 *mir-274* 於三齡眼碟中表現狀況，發現 *mir-274* 廣泛(ubiquitous)微弱存在於果蠅三齡幼蟲眼碟中(圖五 C)。

於眼睛未分化細胞表現 *mir-274* 會增加 Wg 表現

表達 *mir-274* 會影響果蠅複眼的大小(圖一 B-B’’)，我進一步探討 *mir-274* 是否會影響到果蠅眼睛發育之正向與負向訊號傳遞鏈。Eyeless 與 Notch 訊號傳遞鏈為眼碟發育過程中最重要的正向調控因子。Eyeless 訊息傳遞主要與決定眼睛細胞命運相關，而 Notch 訊號傳遞主要調控細胞增生(Singh et al., 2012)。Notch 會透過 *eyegone(eyg)* 調控 Jak/STAT 訊息鏈配體 *unpaired(upd)*，影響眼碟細胞增生(Chao et al., 2004)。Wingless 訊號傳遞是眼睛發育最主要的負向訊息傳遞鏈，表達 Wingless 訊號傳遞鏈會抑制眼睛發育(Treisman and Rubin, 1995)。在三齡幼蟲時，於眼碟未分化之細胞表達 *mir-274* (*ey>mir-274*)，透過組織免疫染色發現 *mir-274* 會降低 Eyeless 訊號傳遞下游基因 Eyes absent(Eya)與 Dachshund(Dac)蛋白表現(圖六 B, D)。表達 *mir-274* 也會使 Notch 訊號傳遞中 Eyg 的表現量下降(圖六 F)，利用 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的報告基因 10XSTAT-GFP-NLS(圖六 L)(Bach et al., 2007)來偵測 Jak/STAT 訊息活性，表達 *mir-274* 也會促使 Notch 訊號傳遞下游 Jak/STAT 訊息活性下降(圖六 H)。*ey>mir-274*

使眼睛發育之負向因子 Wingless 訊號傳遞中 Wingless(Wg)及下游基因 Homothorax(Hth)的蛋白表現上升(圖六 K-K'')。表達 *mir-274* 同時降低 *wg* 一半劑量時，可部分恢復果蠅成蟲眼睛大小(圖二 D-D'')。由上述結果發現 *ey>mir-274* 所導致小眼表現型主要是因為抑制 Eyeless 與 Notch 這兩條正向調控眼睛發育訊息傳遞鏈，及提高負向調控眼睛發育的 Wingless 訊息傳遞鏈所致。

表達 *mir-274* 時並不會抑制內生性 *upd* 表現且會引發細胞移行

MicroRNAs 調控其目標基因主要是抑制基因表現，我的結果發現表現 *mir-274* 時會促使 Wg 及其下游基因 Hth 蛋白表現量上升(圖六 K', K'')，因此我推測表達 *mir-274* 時可能抑制了負向調控 Wg 訊號傳遞鏈的分子。而過去研究已知 Jak/STAT 及 Dpp 這兩個訊息傳遞鏈皆會負向調控 Wg 訊息傳遞鏈(Chanut and Heberlein, 1997; Ekas et al., 2006; Tsai et al., 2007)。我透過 *dpp-Gal4* 大量表現 *mir-274* (*dpp>mir-274*)，並利用 *dpp-LacZ* 來偵測 *dpp* 表現是否有受到影響。發現 *dpp>mir-274* 眼碟兩側視神經細胞的發育受到抑制(圖七 C)。在正常三齡幼蟲時期 *dpp-LacZ* 訊號會隨著型態生成凹溝(morphogenetic furrow, MF)一起往前端移動而形成一直線，我發現 *dpp>mir-274* 其眼碟兩側 *dpp-LacZ* 訊號並未隨 MF 移動有延遲現象(圖七 C)。*dpp* 的表達不受到 *mir-274* 影響，但 Dpp 訊息鏈促使 MF 啟動的作用受到 *mir-274* 抑制，因此我

推論表達 *mir-274* 可能是影響到 Dpp 訊息傳遞鏈的下游基因。

在 *ey>mir-274* 中觀察到 Jak/STAT 訊息鏈活性受到抑制(圖六 H)，因此我想透過觀察於眼睛發育中 Jak/STAT 訊息傳遞鏈最重要配體 Upd 表達是否有受到影響，藉由 *upd-LacZ* 來觀察 *upd* 表現(Tsai and Sun, 2004)。利用 *eyg-Gal4* 將 *mir-274* 與 GFP(*eyg>GFP+mir-274*)同時表達於果蠅眼碟中線，藉由 GFP 標定 *mir-274* 所表達的細胞，結果發現 *eyg>GFP+mir-274* 並不會抑制 *upd-LacZ* (data not shown)。或利用 *dpp-Gal4* 將 *mir-274* 與 GFP(*dpp>GFP+mir-274*)同時表達於果蠅眼碟邊緣，藉由 GFP 標定 *mir-274* 所表達的細胞，發現 *dpp>GFP+mir-274* 也不會抑制 *upd-LacZ* (圖七 D'')。可推測先前 *ey>mir-274* 抑制 Jak/STAT 訊息鏈活性可能不是透過抑制 Jak/STAT 訊息鏈配體 *upd* 所致。此外我意外發現，在 *dpp>GFP+mir-274* 中，GFP 表達的細胞會離開 *dpp-Gal4* 表現區域眼碟側邊邊緣，移行至眼碟內部，*mir-274* 會造成細胞移行(cell migration)的表現型，並且 *mir-274* 促使 *upd-LacZ* 表達的細胞非自主性(non-autonomous)的細胞移行(圖七 D', D'')。

mir-274 可於眼碟及翅碟中引發 Wg 表現與細胞移行現象並無組織特

異性

於眼碟中表現 *mir-274* 時，會提高 Wg 蛋白表現與細胞移行的現象(圖六 K'，圖七 D'，圖八 C, C')，為了解 *mir-274* 活化 *wg* 表達及影

響細胞移行是否有組織特異性，並且果蠅幼蟲眼碟發育十分動態，研究細胞移行較不易，因此我觀察與眼碟一樣是由上皮細胞所組成的翅碟上。我利用 *dpp-Gal4* 將 *mir-274* 與 GFP(*dpp>GFP+mir-274*)同時表達於果蠅翅碟前後端中線上(A-P boundary)，利用 GFP 標定 *mir-274* 所表達細胞，透過 Wg 蛋白免疫染色，觀察到 *mir-274* 在三齡幼蟲翅碟中也會提高 Wg 蛋白表現(圖八 G, G')。顯示 *mir-274* 不論於眼碟或翅碟中都會提高 Wg 蛋白表現。*mir-274* 為間接活化 *wg*，我想瞭解 *mir-274* 是否於轉錄層級即提高 *wg* 表現？藉由 *wg-lacZ* 偵測轉錄時期 *wg* 表現，結果發現表達 *mir-274* 不論在眼碟(*dpp>mir-274*)或翅碟(*dpp>GFP+mir-274*)中於轉錄時期皆會提高 *wg-lacZ* 表現(圖八 D, D', H, H')。*mir-274* 不論轉錄或轉譯時期皆會提高 *wg* 表現，並且無組織特異性。並且我利用 GFP 來標示 *mir-274* 所表達的細胞，也觀察到於翅碟中，原本表達在前後端中線的細胞也會造成細胞移行的現象(圖八 G)。從我的結果發現表達 *mir-274* 不論於眼碟或翅碟，都會引發細胞移行現象。

表達 *mir-274* 時降低 *wg* 劑量可抑制細胞移行

在眼碟及翅碟中表達 *mir-274* 時會提高 Wg 表現以及細胞移行現象，因此我想了解此兩種表現型是否有關連？過去研究已顯示 Wingless 訊號傳遞鏈參與在正常胚胎發育時期會和原腸胚形成

(gastrulation) 與體軸形成這類需要細胞移行的發育過程 (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980)。並且近年來許多研究指出 Wingless 訊號傳遞與癌細胞的轉移有關 (Bienz and Clevers, 2000; Das et al., 2012; Verras and Sun, 2006)。我在 *dpp>GFP+mir-274* 果蠅翅碟中，利用 GFP 標定 *mir-274* 表現之細胞，觀察到部分表達 GFP 的細胞會離開 *dpp-Gal4* 表現區域前後端中線。我在 *dpp>GFP+mir-274* 果蠅中降低 *wg* 劑量，觀察細胞移行是否有受到影響。我透過兩個不同 *wg* 突變株：*wg^{spd-flg}* 與 *wg^{CX4}* 來降低 *wg* 劑量，觀察到在 *dpp>mir-274* 時再降低 *wg* 劑量不論在眼碟或翅碟皆可抑制細胞移行表現型 (圖九 B, C, E, F)，並且於眼碟中可部分恢復 *dpp>mir-274* 所造成的視神經缺陷與眼碟大小 (圖九 H)。綜合上述結果，Wingless 訊息鏈參與 *mir-274* 所導致細胞移行之中。

表達 *mir-274* 時抑制細胞凋亡路徑可抑制細胞移行

於眼睛未分化區域表現 *mir-274* 時會引起細胞凋亡 (圖三 C, F)。在文獻指出在正常發育時細胞移行與細胞凋亡常伴隨一起 (Bischoff and Cseresnyes, 2009; Manjon et al., 2007)，因此我想知道 *mir-274* 所導致的細胞移行是否伴隨細胞凋亡。透過原位末端轉移酶標定技術 (TUNEL assay) 與活化型細胞凋亡蛋白 3 (activated-caspase 3) 免疫染色，我在 *dpp>GFP+mir-274* 的翅碟中發現，*mir-274* 所引起之細胞移

行同時會引起細胞凋亡(圖十 A, A')。 *dpp>dsRed+mir-274* 利用 *dsRed* 標示 *mir-274* 表達細胞，發現 *mir-274* 表達細胞產生細胞凋亡外，其他周圍的細胞也觀察到細胞凋亡，顯示 *mir-274* 會引起非自主性細胞凋亡 (non-autonomous) (圖十 B, B')。

有文獻指出當抑制細胞凋亡時會使細胞移行現象更嚴重(Das et al., 2012)，因此我想了解 *mir-274* 所導致的細胞移行是否有類似的現象。我在 *dpp>GFP+mir-274* 果蠅中，利用 GFP 標示 *mir-274* 所表達細胞，透過同時表達 *p35*、利用 microRNA 剔除 *reaper*、*hid* 與 *grim* (miRGH)或同時表現細胞凋亡路徑中最重要負向調控者 *Diap1* 抑制細胞凋亡路徑，發現 *mir-274* 所導致細胞移行現象因此受到抑制 (圖十 C-E')。先前已有文獻指出 *Diap1* 除了在細胞凋亡路徑中的角色外，也參與在果蠅卵巢發育過程中邊境細胞(Border cell) 細胞移行 (Geisbrecht and Montell, 2004)。在此可推測 *mir-274* 所引發之細胞移行可能透過與細胞凋亡相關基因參與。

mir-274 所引起之細胞移行現象會降低連接蛋白表現，提高表皮細胞間質化標誌蛋白

正常上皮細胞會透過連接蛋白(junction protein)(例如：鈣依賴性細胞黏附分子 E (E-cadherin)、 β 連環蛋白(β -Catenin))與旁邊細胞緊密結合，辨別出其細胞極性，以維持正常組織構型(Lamouille et al.,

2013)。表皮細胞間葉化(Epithelial-mesenchymal transition , EMT)是指上皮細胞型態改變為間葉細胞(mesenchyme cell)型態的一種過程，原本是指於胚胎時期與器官發育時期的一種現象。近年有許多文獻指出當癌細胞要轉移時，也會進行 EMT 的過程，因此 EMT 也被視為癌化指標之一(Yilmaz and Christofori, 2009)。我的結果發現表達 *mir-274* 時會引起表皮細胞移行，*dpp>GFP+mir-274* 透過共軛焦顯微鏡掃描 Z 軸疊圖後前後端(anterior-posterior)切面圖，可觀察到 GFP 所標定 *mir-274* 表達的細胞遠離頂端(apical)往基層(basal)移動，或往翅碟前後端兩側移動遠離原本 *dpp-Gal4* 表現區域(圖十一 I)。*dpp>GFP* 翅碟背腹端(dorsal-ventral)切面圖中，GFP 所標定細胞原本應為柱狀整齊排列靠向頂端(apical)(圖十一 F)。*dpp>GFP+mir-274* 翅碟背腹端(dorsal-ventral)切面圖顯示，GFP 所標定 *mir-274* 表達細胞變圓失去柱狀構型，且遠離頂端(圖十一 G)。利用 *wg-Gal4*、*omb-Gal4* 與 *ap-Gal4* 於翅碟不同區域表達 *mir-274* 時，也都觀察到 *mir-274* 引發細胞移行表現型(圖十二 D, E', F')。*ap>GFP+mir-274* 翅碟背腹端(dorsal-ventral)切面圖中，可發現 GFP 所標示 *mir-274* 表達細胞離開背端(dorsal)表達區域，移動至腹側(ventral)，並且有侵襲(invasion)至 peripodial membrane 現象(圖十二 G)。

為了瞭解 *mir-274* 所造成細胞移行是否會影響表皮細胞細胞極性

及細胞骨架，我觀察 *dpp>GFP+mir-274* 翅碟上皮細胞的細胞骨架構型，我利用螢光標示的 phalloidin 觀察絲肌動蛋白(F-Actin)，發現表達 *mir-274* 會改變翅碟細胞骨架構型，使 F-actin 有點狀聚集之現象(圖十一 C, C')。我藉由組織免疫螢光染色觀察兩個重要連接蛋白:E-cadherin 與 β -Catenin(Arm)，結果發現 *mir-274* 所導致的細胞移行會促使 E-cadherin 與 β -Catenin 兩者蛋白表現量降低(圖十一 D-E')。於 *dpp>GFP+mir-274* 果蠅中同時表達 E-cadherin(*shotgun, shg*)，結果顯示提高 E-cadherin 的量，可抑制 *mir-274* 所引發細胞移行(圖十五 E)。

為了進一步確定 *mir-274* 所導致細胞移行是因引發表皮細胞間葉化(EMT)，我偵測兩種上皮細胞間葉化標誌蛋白(mesenchymal cell marker)：鈣依賴性細胞黏附分子 N (N-cadherin)與基質金屬蛋白酶-1 (metalloproteinase-1, MMP1)我發現表現 *mir-274* 時會顯著提升 N-cadherin 與 MMP-1 的表現量(圖十三 E-F')。觀察 *dpp>GFP+mir-274* 於翅碟中，是否會提高細胞移行相關蛋白表現。我檢測 Rho 家族蛋白中 Rho1 蛋白，Rho 家族蛋白調控肌動蛋白細胞骨架重整(actin cytoskeleton organization)及細胞移行貼附行為(cell adhesion)等 (Bishop and Hall, 2000)。以及觀察 small GTPase Rab11，Rab11 透過調控 Rac 活性來影響細胞移行(Ramel et al., 2013)。我的結果顯示

dpp>GFP+mir-274 會提高 Rho1 與 Rab11 蛋白表現(圖十三 G-H')。表示 *mir-274* 可能透過提高 Rho1 與 Rab11 而影響到細胞移行與改變細胞骨架。

表達 *mir-274* 於眼碟與翅碟中皆會提高 *puc-LacZ* 表現

表達 *mir-274* 於眼碟及翅碟中皆會引發細胞凋亡與 *wg* 表現量上升(圖八, 圖十 A-B')。文獻指出當細胞凋亡時可啟動代償性細胞增生(compensatory proliferation)(Fan and Bergmann, 2008)。未分化細胞代償性細胞增生主要是透過 Dronc 活化 JNK 訊息傳遞鏈, 進而促使 Dpp 訊息鏈與 Wg 訊息鏈活化引發細胞增生(Fan and Bergmann, 2008; Morata et al., 2011)。因此我於 *dpp>GFP+mir-274* 背景下, 利用 *puc-LacZ(puc^{E69})* 來偵測 JNK 訊息鏈活性。結果顯示 *dpp>GFP+mir-274* 不論於眼碟或翅碟, GFP 標示 *mir-274* 表現細胞區域皆顯著提高 *puc-LacZ* 表現(圖十四 B-D')。*mir-274* 可能透過影響 JNK 訊息傳遞鏈而提高 *wg* 表現。

Wingless 訊息傳遞鏈的負向調控者: APC 與 Axn 可能為 *mir-274* 目

標基因

為了瞭解 *mir-274* 是透過調控哪些目標基因, 來提高 *wg* 表達及引發細胞移行表現型。因此我利用目前三個最主要的預測 microRNA 目標基因資料庫: microRNA、miRBase 與 TargetScanFly 來做分析(Betel

et al., 2008; Griffiths-Jones et al., 2006; Luo and Sehgal, 2012; Ruby et al., 2007), 透過比對三資料庫預測 *mir-274* 可能的目標基因, 從中尋找 *mir-274* 真正的目標基因。於 *ey>mir-274* 實驗中發現會抑制眼睛發育正向調控 Eyeless 與 Notch 訊息鏈。在前面實驗中我發現表達 *mir-274* 時會提高 Wg 的表現, 但 microRNA 目前已知是透過抑制目標基因表達來調控基因表達, 所以 *mir-274* 目標基因篩選條件為: 一為 Eyeless 與 Notch 訊息鏈中基因, 二為 Wingless 訊息傳遞鏈的負向調控基因。已知 Jak/STAT 及 Dpp 這兩個訊息傳遞鏈皆會負向調控 Wg 訊息鏈(Chanut and Heberlein, 1997; Ekas et al., 2006; Tsai et al., 2007)。再來表達 *mir-274* 時會導致細胞移行, 因此會影響到細胞移行的基因是否有在其中。最後一個篩選條件為此三個資料庫中, 共同預測被 *mir-274* 所調控的基因。透過以上條件的篩選, 我發現 APC 與 Axn 這兩個 Wingless 訊息傳遞鏈的負向調控者被預測為 *mir-274* 目標基因(附圖二 A)。*mir-274* 除了核心區域(seed region)預測可與 APC 與 Axn 序列完全配對外, *mir-274* 核心區域以外序列和 APC 與 Axn 序列也有部分氫鍵配對(附圖二 B)。若 *mir-274* 會與 APC 或 Axn 序列結合, 核心區域以外序列氫鍵配對可加強 *mir-274* 與 APC 或 Axn 序列的結合能力。

我初步透過遺傳交互作用(genetic interaction)檢測 Axn 是否為

mir-274 目標基因。*Axn* 為 *Wingless* 訊息傳遞鏈的負向調控者，降低 *Axn* 表現會使 *Wingless* 訊息鏈活性上升。表達 *mir-274* 會引發細胞移行，若表達 *mir-274* 同時降低 *wg* 劑量則可抑制細胞移行性狀(圖九 B, C)。因此 *dpp>GFP+mir-274* 背景下，利用 *Axn dsRNA* 與 *P{EPgy2}Axn^{EY10228}* 降低 *Axn* 劑量，可能會因 *wg* 劑量上升而影響 *mir-274* 所引發細胞移行性狀。我的結果初步顯示表達 *mir-274* 同時降低 *Axn* 劑量，會部分加強 *mir-274* 所引起細胞骨架變形性狀(圖十五 C, D)。未來仍需透過不同的 *Axn* 或 *APC* 突變株與 *mir-274* 做遺傳交互作用實驗，以及透過冷光酵素活性測定(Luciferase assay)，來驗證 *Axn* 與 *APC* 是否為 *mir-274* 目標基因。

利用 TALEN 技術產生 *mir-274* 缺失果蠅株

透過 Gal4-UAS 系統大量表達 *mir-274* 實驗中，發現表達 *mir-274* 會造成細胞移行，我想了解內生性 *mir-274* 是否參與細胞移行相關的過程。透過 TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease)技術(Liu et al., 2012)，有機會使 *mir-274* 核心區域(seed region)序列被刪減，而使 *mir-274* 核心區域(seed region)序列受到破壞，產生 *mir-274* 缺失果蠅株(*mir-274* TALEN 設計見附圖三，果蠅篩選方法見附圖四)。得到 *mir-274* 缺失果蠅株後，可透過遺傳交互作用觀察 *mir-274* 所導致細胞移行可能影響那些基因，了解內生性 *mir-274* 對於果蠅發育上的

角色。

人類 *mir-758* 可能為果蠅 *mir-274* 同源 microRNA

於果蠅中我發現表達 *mir-274* 有細胞移行性狀。近年有文獻指出 microRNA 可做為致癌基因(oncogenes) (Hammond, 2006; Zhang et al., 2007)，如人類 *mir-21* 於許多癌症中表現量會上升，提高與細胞移行有關基因 MMP2 和 MMP9 表現，抑制腫瘤抑制基因 (tumor suppressor) PTEN、RACK 表達 (Baranwal and Alahari, 2010)。我想知道在人類基因組中是否存在與 *mir-274* 同源 microRNA，此外這個可能的人類同源 microRNA 是否也與細胞移行有關。因此我利用 UCSC 基因體搜尋資料庫 (UCSC Genome Browser database) (<http://genome.ucsc.edu/>) (Meyer et al., 2013) 將 *mir-274* 基因組 DNA (genomic DNA) 與已公開基因體定序物種序列比對，尋找 *mir-274* 可能同源 microRNA。發現已公開基因體定序的物種中，黑猩猩、黑金剛、羊、牛、海豚及松鼠等脊椎動物，比對到可能為 *mir-274* 同源序列區域 (圖十六 A)。 *mir-274* 基因組 DNA 比對到的序列，和 *mir-274* 結合目標基因的核心區域 (seed region) 序列高度相似 (圖十六 A')，因此比對到區域極有可能為 *mir-274* 同源序列區域。且觀察到 *mir-274* 基因組 DNA 比對到的序列前後，不同物種間序列有高度相似 (圖十六 A)。

並且透過比對 *mir-274* 核心區域(seed region)，來搜尋人類可能同源 microRNA。由於 microRNA 的核心區域(seed region)序列十分的短，只有六到七個核苷酸，無法直接透過資料庫做 BLAST 分析。首先從 miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 將以發表的成熟 microRNA(mature microRNA)序列以 FASTA 形式下載回來，利用 UltraEdit 軟體分析，使用搜尋，輸入 *mir-274* 核心區域，找出可能人類同源 microRNA。透過此方法找到三個 *mir-274* 可能的人類同源 microRNA：*mir-758*、*mir-2113* 與 *mir-5010*(李建全先生協助分析，國家衛生研究院陳俊宏實驗室)。其中 *mir-758* 核心區域與 *mir-274* 完全相同，*mir-2113* 與 *mir-5010* 核心區域與 *mir-274* 僅有一個鹼基差異(圖十六 B)。透過序列比對人類 *mir-758* 極有可能為果蠅 *mir-274* 同源 microRNA。*mir-274* 表達時會提高 *wg* 表現與細胞移行表現型，未來可觀察表達人類 *mir-758* 是不是也會有一樣表現型。若 *mir-274* 有確定的目標基因，也可透過觀察人類 *mir-758* 是否會調控同一目標基因。目前我透過 TALEN 技術產生 *mir-274* 缺失果蠅，未來可於 *mir-274* 缺失果蠅中，補回 *mir-274* 可能人類同源 microRNA，如可恢復 *mir-274* 缺失後表現型，則此人類 microRNA 則為 *mir-274* 同源 microRNA。

討論

從我的研究中發現，表達 *mir-274* 時會引發細胞凋亡，*mir-274* 在轉錄層級提高 *wingless(wg)* 表現，導致果蠅小眼表現型。*mir-274* 廣泛表達於果蠅三齡幼蟲眼碟及翅碟中。*mir-274* 表現時會引發細胞移行。透過遺傳交互作用實驗發現表現 *mir-274* 同時降低一半 *wg* 劑量，可部分恢復果蠅眼睛大小與抑制 *mir-274* 所導致細胞移行性狀。利用生物資訊方式，*APC* 與 *Axn* 兩個 *Wingless* 負向調控者可能為 *mir-274* 目標基因。

mir-274 所導致小眼表現型可能的機制

表達 *mir-274* 於眼碟未分化細胞(*ey>mir-274*)時會造成成蟲小眼表現型(圖一 B-B")。*ey>mir-274* 在三齡幼蟲眼碟發現會引起細胞凋亡，但於 *ey>mir-274* 果蠅中同時抑制細胞凋亡路徑，可減少細胞凋亡訊號，但不能恢復 *mir-274* 所導致小眼表現型(圖二)。表達 *mir-274* 於眼碟未分化細胞會影響細胞增生，*ey>mir-274* 同時補回細胞週期重要調控蛋白細胞週期蛋白 *Cyclin E(cycE)*，也只能部分恢復眼碟大小(圖四)。以上結果顯示，*ey>mir-274* 所造成小眼外表型主因並非 *mir-274* 引發細胞凋亡或影響細胞增生導致。表達 *ey>mir-274* 在幼蟲眼碟，發現 *mir-274* 會抑制眼睛發育正向調控訊息傳遞鏈：*Eyeless* 訊息傳遞

鏈及 Notch 訊息傳遞鏈下游基因(圖六)。表現 *mir-274* 會抑制 Eyeless 訊息傳遞鏈下游 Eya 及 Dac 蛋白表現，抑制 Notch 訊息傳遞鏈下游 Eyg 蛋白與 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性(圖六 B, D, F, H)。 *ey>mir-274* 會提高負向調控眼睛發育 Wingless 訊息傳遞鏈中，Wg 與 Hth 蛋白表現(圖六 K', K'')在。 *ey>mir-274* 果蠅中同時降低 *wg* 劑量時可部分恢復果蠅成蟲眼睛大小(圖九 H)。綜合以上可推論 *mir-274* 所造成小眼表現型應該為眼睛發育負向調控 Wingless 訊息鏈上升所致。

MicroRNAs 調控目標基因主要是透過抑制基因，我的結果發現表現 *mir-274* 時會使 Wg 及其下游基因 Hth 蛋白表現量上升，因此我推測表達 *mir-274* 時可能抑制負向調控 Wg 訊號傳遞鏈分子，間接提高 *wg* 表現。已知 Jak/STAT 以及 Dpp 這兩個訊息傳遞鏈皆會負向調控 Wg 訊息傳遞鏈(Chanut and Heberlein, 1997; Ekas et al., 2006; Tsai et al., 2007)。Notch 會透過 *eyg* 調控 Jak/STAT 訊息鏈的配體 *upd* 表達，活化 Jak/STAT 訊息鏈影響眼碟細胞增生(Chao et al., 2004)。 *ey>mir-274* 會抑制 Eyg 表現與抑制 Jak/STAT 訊息活性(圖六 F)。利用 *eyg-Gal4* 或 *dpp-Gal4* 表達 *mir-274(eyg>GFP+mir-274; dpp>GFP+mir-274)*，藉由 *upd-LacZ* 觀察 Jak/STAT 訊息傳遞鏈配體 *upd*，發現 *mir-274* 不會抑制 *upd* 表達(圖七 D)。*mir-274* 抑制 Jak/STAT 訊息鏈活性並非透過其配體 *upd*。因此我推論 *ey>mir-274* 抑制

Jak/STAT 訊息活性，為 *mir-274* 抑制 Jak/STAT 訊息鏈其他正向調控者，並不透過 *upd* 來影響 Jak/STAT 訊息傳遞鏈。Jak/STAT 訊息傳遞鏈會負向調控 Wg 訊息傳遞鏈(Ekas et al., 2006; Tsai et al., 2007)。表達 *mir-274* 觀察到 *wg* 上升，推測可能因 *mir-274* 抑制 Jak/STAT 訊息傳遞鏈導致。*dpp>mir-274* 透過 *dpp-LacZ* 偵測 *dpp* 表現，*mir-274* 表現時不會直接抑制 *dpp* 表現，但觀察到 Dpp 訊息鏈啟動型態生成凹溝 (morphogenetic furrow, MF) 的作用受到抑制(圖七 C)，顯示表達 *mir-274* 時會影響到 Dpp 訊息鏈下游基因。Dpp 訊息鏈已知會抑制 Wg 訊息傳遞鏈(Chanut and Heberlein, 1997)，因此 *mir-274* 所引發 *wg* 表現可能是因抑制 Dpp 訊息鏈下游基因而促使 *wg* 表現上升。

綜合以上結果，我推論 *mir-274* 所導致果蠅小眼表現型可能機制為，表達 *mir-274* 時會抑制正向調控眼睛發育訊息傳遞鏈：Eyeless 訊息傳遞鏈及 Notch 訊息傳遞鏈，同時抑制 Wingless 訊息鏈的負向調控者：Jak/STAT 訊息鏈與 *dpp* 訊息鏈活性，且 *mir-274* 抑制 Jak/STAT 訊息活性並不是透過 Jak/STAT 訊息鏈配體 *upd*(圖十七)。因此表達 *mir-274* 時眼睛發育負向調控者 Wingless 訊息傳遞鏈下游基因表現上升，可能是導致果蠅小眼表現型的主要原因。

mir-274 所導致細胞凋亡與細胞移行可能的機制

表現 *mir-274* 在果蠅三齡幼蟲眼碟與翅碟時，會提高 *wg* 表現(圖

八)，引發非自主性細胞凋亡與細胞移行(圖十 B)。當表達 *mir-274* 同時降低 *wg* 一半劑量，可抑制 *mir-274* 所引發細胞移行(圖九 B, C，圖十 F)及抑制部分細胞凋亡(圖十 F')。已有文獻指出 Wingless 訊息傳遞鏈與細胞移行有關(Das et al., 2012; Muller et al., 2002)。當我單獨表現 *wg* 在翅碟時會引發非自主性細胞凋亡，但不足以引發細胞移行(data not shown)。Wg 訊息鏈已知會影響細胞移行，透過影響細胞移行相關基因，如：*MMP2* 與 *Twist*(Howe et al., 2003; Wu et al., 2007)。推論 *mir-274* 所引發細胞移行，為 *wg* 表現提高且 Wg 訊息鏈引發其它與細胞移行有關基因一起合作所致。*dpp>GFP+mir-274* 果蠅中降低 *wg* 劑量，會使細胞凋亡訊號減少(圖十 F')。*mir-274* 所導致的非自主性細胞凋亡 *wg* 應參與其中。

利用 *dpp-Gal4* 同時表現細胞凋亡基因 *hid* 與 GFP 時(*dpp>GFP+hid*)，會引發大量細胞凋亡與局部細胞移行至基層(basal)(圖十一 J)，利用 GFP 所標定 *hid* 表達細胞時，觀察到細胞會變得較小且細碎。*dpp>GFP+mir-274* 雖也引發細胞凋亡與細胞移行(圖十 A-B')，但明顯與 *dpp>GFP+hid* 所引發細胞移行形態不同。*mir-274* 所引發之細胞移行透過共軛焦顯微鏡掃描 Z 軸後前後端切面圖可觀察到，GFP 標定 *mir-274* 表現細胞除了移動至基層(basal)外也有往表層(apical)移動現象，且 *mir-274* 表達細胞移動範圍較廣(圖十

一 I)。

表達 *mir-274* 同時透過 *p35*、利用 microRNA 剔除細胞凋亡基因 (*reaper*、*hid* 和 *grim*)(*miRGH*)與表現細胞凋亡路徑負向調控者 *Diap1* 雖抑制細胞移行但沒有完全抑制活化態 Caspase 3 訊號(圖十)。

dpp>GFP+mir-274 同時表達 *p35(dpp>GFP+mir-274+p35)*、*miRGH* (*dpp>GFP+mir-274+miRGH*)或 *Diap1(dpp>GFP+mir-274+Diap1)*，觀察到完全不同型態活化態 Caspase 3 訊號。*dpp>GFP+mir-274+p35* 活化態 Caspase 3 訊號為細碎點狀且比 *dpp>GFP+mir-274* 活化態 Caspase 3 訊號多(圖十 C')。*dpp>GFP+mir-274+miRGH* 活化態 Caspase 3 呈現許多單顆細胞明顯訊號，較 *dpp>GFP+mir-274* 訊號多(圖十 D')。

dpp>GFP+mir-274+Diap1 活化態 Caspase 3 訊號較 *dpp>GFP+mir-274* 分散與細碎點狀(圖十 E')。實驗所用活化態 Caspase 3 抗體(Cell Signaling)原為辨識人類活化態 Caspase 3 抗體，過去研究認為此抗體透過辨識同一活化態 Caspase 3 表位(epitope)來辨識果蠅活化態 Drice 與 Dcp1，藉此反應果蠅細胞凋亡路徑活化(Fan and Bergmann, 2010; Xu et al., 2006; Yu et al., 2002)。果蠅 Drice 與 Dcp1 藉由上游 Dronc 切割後，引發細胞凋亡(Hay et al., 2004)。目前文獻指出活化態 Caspase 3 抗體(Cell Signaling)不只辨認果蠅活化態 Drice 與 Dcp，同時也可辨識到 Dronc 其他受質(substrate)，藉此反應 Dronc 活性，而此未知 Dronc

受質並不參與細胞凋亡作用(Fan and Bergmann, 2010)。前人研究 Dronc 除了引發細胞凋亡外，在細胞凋亡所產生的代償性增生(compensatory proliferation)中扮演非細胞凋亡角色(Huh et al., 2004)。因此表達 *mir-274* 同時透過 *p35*、*miRGH* 與 *Diap1* 抑制細胞凋亡時所觀察到活化態 Caspase 3 訊號，可能為辨識到 Dronc 其他受質。推測 Dronc 所引發下游基因可能是一個細胞凋亡及細胞移行路徑中的中介者。因此雖抑制細胞凋亡途徑，但仍觀察到不同類型活化態 Caspase 3 訊號，同時抑制 *mir-274* 所引發細胞移行。目前已知傳統細胞凋亡路徑中組成基因參與細胞移行之中，有細胞凋亡負向調控者 *Diap1*，被報告參與在果蠅卵巢邊境細胞(border cell)細胞移行之中(Geisbrecht and Montell, 2004)。而 *mir-274* 所引發細胞凋亡可能不只透過傳統細胞凋亡路徑。因 *dpp>dsRed+mir-274+Diap1* 透過 TUNEL assay 偵測細胞凋亡時，雖抑制細胞凋亡路徑但仍可偵測到 TUNEL 訊號(data not shown)，顯示 *mir-274* 可能透過自體吞噬(autophagy)其他途徑而產生細胞凋亡。

表達 *mir-274* 時，透過 *puc-LacZ* 顯示可引發 JNK 訊息鏈活化(圖十四)。文獻指出細胞凋亡引起代償性增生可活化 JNK 訊息鏈，透過 JNK 訊息鏈活化 *Dpp* 訊息鏈與 *Wg* 訊息鏈(Fan and Bergmann, 2008; Morata et al., 2011)。*mir-274* 所引發 *wg* 表達，推測可能透過細胞凋亡

引起的代償性增生引發 JNK 訊息鏈而活化 *wg* 表達。另一種可能為已知非典型 Wnt 訊息鏈中，Wnt/planar cell polarity pathway，會透過 Dsh 活化 JNK 訊息傳遞鏈，調控果蠅眼睛平面細胞極性(planar cell polarity)(Boutros et al., 1998)。於果蠅早期眼碟中，*wg* 也可提高 JNK 訊息鏈表現(Singh et al., 2006)。因此也可能是因為 *mir-274* 引發 *wg* 表現而提高 JNK 訊息鏈的活性。而 JNK 訊息鏈對於細胞移行是必要的(Huang et al., 2004)。*mir-274* 表現時可引發細胞移行，推測 JNK 訊息鏈參與其中。

我推論 *mir-274* 所導致細胞凋亡與細胞移行可能有兩種機制。一為 *mir-274* 抑制 Wingless 訊息傳遞鏈負向調控者 *x* 基因，進而提高 *wg* 表現導致細胞凋亡，細胞凋亡引起代償性增生促使 JNK 訊息鏈活化而產生正向回饋給 *wg*。JNK 訊息鏈活化與細胞凋亡發生時皆會引發細胞移行，因此使我觀察到表達 *mir-274* 會提高 *wg* 表現、細胞凋亡與細胞移行表現型(圖十八 A)。二為 *mir-274* 抑制 Wingless 訊息傳遞鏈負向調控者 *x* 基因，進而提高 *wg* 表現，*wg* 活化 JNK 訊息鏈。而 *wg* 與 JNK 訊息鏈皆會引發細胞凋亡(data not shown, Liu and Lin, 2005)。JNK 訊息鏈與細胞凋亡皆會導致細胞移行。因此觀察到 *wg* 表現及 JNK 訊息鏈活性提高，進而導致細胞凋亡與細胞移行(圖十八 A')。

参考文献

Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T., and Perrimon, N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes & development* *12*, 2610-2622.

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 expression patterns : GEP* *7*, 323-331.

Baker, N.E. (1988). Transcription of the segment-polarity gene wingless in the imaginal discs of Drosophila, and the phenotype of a pupal-lethal wg mutation. *Development* *102*, 489-497.

Baranwal, S., and Alahari, S.K. (2010). miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer* *126*, 1283-1290.

Bate, M., and Martinez Arias, A. (1993). The Development of Drosophila melanogaster (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Bejsovec, A., and Martinez Arias, A. (1991). Roles of wingless in patterning the larval epidermis of Drosophila. *Development* *113*, 471-485.

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics* *35*, 215-217.

Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic acids research* *36*, D149-153.

Bienz, M., and Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* *103*, 311-320.

Bischoff, M., and Cseresnyes, Z. (2009). Cell rearrangements, cell divisions and cell death in a migrating epithelial sheet in the abdomen of Drosophila. *Development* *136*, 2403-2411.

Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *The Biochemical journal* 348 Pt 2, 241-255.

Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.

Borod, E.R., and Heberlein, U. (1998). Mutual regulation of decapentaplegic and hedgehog during the initiation of differentiation in the *Drosophila* retina. *Developmental biology* 197, 187-197.

Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I., and Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109-118.

Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology* 3, e85.

Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports* 9, 582-589.

Bushati, N., and Cohen, S.M. (2007). microRNA functions. *Annual review of cell and developmental biology* 23, 175-205.

Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.

Chang, T., Mazotta, J., Dumstrei, K., Dumitrescu, A., and Hartenstein, V. (2001). Dpp and Hh signaling in the *Drosophila* embryonic eye field. *Development* 128, 4691-4704.

Chanut, F., and Heberlein, U. (1997). Role of decapentaplegic in initiation and progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* retina. *Development* *124*, 559-567.

Chao, J.L., Tsai, Y.C., Chiu, S.J., and Sun, Y.H. (2004). Localized Notch signal acts through *eyg* and *upd* to promote global growth in *Drosophila* eye. *Development* *131*, 3839-3847.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.

Chien, A.J., Conrad, W.H., and Moon, R.T. (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *The Journal of investigative dermatology* *129*, 1614-1627.

Cho, K.O., Chern, J., Izaddoost, S., and Choi, K.W. (2000). Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in *Drosophila*. *Cell* *103*, 331-342.

Das, T.K., Sangodkar, J., Negre, N., Narla, G., and Cagan, R.L. (2012). Sin3a acts through a multi-gene module to regulate invasion in *Drosophila* and human tumors. *Oncogene*.

De Craene, B., and Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews Cancer* *13*, 97-110.

Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231-235.

Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development* *18*, 504-511.

Du, T., and Zamore, P.D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* *132*, 4645-4652.

Ekas, L.A., Baeg, G.H., Flaherty, M.S., Ayala-Camargo, A., and Bach, E.A. (2006). JAK/STAT signaling promotes regional specification by negatively regulating wingless expression in *Drosophila*. *Development* *133*, 4721-4729.

Fan, Y., and Bergmann, A. (2008). Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell! *Trends in cell biology* *18*, 467-473.

Fan, Y., and Bergmann, A. (2010). The cleaved-Caspase-3 antibody is a marker of Caspase-9-like DRONC activity in *Drosophila*. *Cell death and differentiation* *17*, 534-539.

Geisbrecht, E.R., and Montell, D.J. (2004). A role for *Drosophila* IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell* *118*, 111-125.

Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology* *10*, 593-601.

Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* *123*, 631-640.

Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* *34*, D140-144.

Hammond, S.M. (2006). MicroRNAs as oncogenes. *Current opinion in genetics & development* *16*, 4-9.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* *18*, 3016-3027.

Harfe, B.D., McManus, M.T., Mansfield, J.H., Hornstein, E., and Tabin, C.J. (2005). The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 10898-10903.

Hay, B.A., Huh, J.R., and Guo, M. (2004). The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. *Nature reviews Genetics* 5, 911-922.

Howe, L.R., Watanabe, O., Leonard, J., and Brown, A.M. (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer research* 63, 1906-1913.

Hu, X., Macdonald, D.M., Huettner, P.C., Feng, Z., El Naqa, I.M., Schwarz, J.K., Mutch, D.G., Grigsby, P.W., Powell, S.N., and Wang, X. (2009). A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 114, 457-464.

Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M.D. (2004). MAP kinases and cell migration. *Journal of cell science* 117, 4619-4628.

Huh, J.R., Guo, M., and Hay, B.A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Current biology : CB* 14, 1262-1266.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.

Hyun, S., Lee, J.H., Jin, H., Nam, J., Namkoong, B., Lee, G., Chung, J., and Kim, V.N. (2009). Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K. *Cell* 139, 1096-1108.

Iorio, M.V., and Croce, C.M. (2012). microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 33, 1126-1133.

Kennell, J.A., Gerin, I., MacDougald, O.A., and Cadigan, K.M. (2008). The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15417-15422.

Klaus, A., and Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature reviews Cancer* 8, 387-398.

Kohn, A.D., and Moon, R.T. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell calcium* 38, 439-446.

Korpai, M., Lee, E.S., Hu, G., and Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of biological chemistry* 283, 14910-14914.

Kumar, J.P. (2001). Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. *Nature reviews Genetics* 2, 846-857.

Kwon, C., Han, Z., Olson, E.N., and Srivastava, D. (2005). MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18986-18991.

Lamouille, S., Subramanyam, D., Blelloch, R., and Derynck, R. (2013). Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. *Current opinion in cell biology* 25, 200-207.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.

Liu, J., and Lin, A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell research* 15, 36-42.

Liu, J., Li, C., Yu, Z., Huang, P., Wu, H., Wei, C., Zhu, N., Shen, Y., Chen, Y., Zhang, B., *et al.* (2012). Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *Journal of genetics and genomics* 39, 209-215.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.

Luo, W., and Sehgal, A. (2012). Regulation of circadian behavioral output via a MicroRNA-JAK/STAT circuit. *Cell* *148*, 765-779.

Ma, C., and Moses, K. (1995). Wingless and patched are negative regulators of the morphogenetic furrow and can affect tissue polarity in the developing *Drosophila* compound eye. *Development* *121*, 2279-2289.

Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P.A., and Moses, K. (1993). The segment polarity gene hedgehog is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell* *75*, 927-938.

Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & development* *19*, 2979-2990.

Manjon, C., Sanchez-Herrero, E., and Suzanne, M. (2007). Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for *Drosophila* leg morphogenesis. *Nature cell biology* *9*, 57-63.

Manoukian, A.S., Yoffe, K.B., Wilder, E.L., and Perrimon, N. (1995). The porcupine gene is required for wingless autoregulation in *Drosophila*. *Development* *121*, 4037-4044.

Meyer, L.R., Zweig, A.S., Hinrichs, A.S., Karolchik, D., Kuhn, R.M., Wong, M., Sloan, C.A., Rosenbloom, K.R., Roe, G., Rhead, B., et al. (2013). The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013. *Nucleic acids research* *41*, D64-69.

Morata, G., Shlevkov, E., and Perez-Garijo, A. (2011). Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*. *Development, growth & differentiation* *53*, 168-176.

Muller, T., Bain, G., Wang, X., and Papkoff, J. (2002). Regulation of epithelial cell migration and tumor formation by beta-catenin signaling. *Experimental cell research* *280*, 119-133.

Neumann, C.J., and Cohen, S.M. (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* *124*, 871-880.

Nusse, R., Theunissen, H., Wagenaar, E., Rijsewijk, F., Gennissen, A., Otte, A., Schuurin, E., and van Ooyen, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus. *Molecular and cellular biology* *10*, 4170-4179.

Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y.K., and Varmus, H. (1984). Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* *307*, 131-136.

Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795-801.

Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development* *22*, 894-907.

Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *4*.

Ramel, D., Wang, X., Laflamme, C., Montell, D.J., and Emery, G. (2013). Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nature cell biology* *15*, 317-324.

Ready, D.F., Hanson, T.E., and Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Developmental biology* *53*, 217-240.

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* *50*, 649-657.

Ruby, J.G., Stark, A., Johnston, W.K., Kellis, M., Bartel, D.P., and Lai, E.C. (2007). Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome research* *17*, 1850-1864.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.

Shinozaki, A., Sakatani, T., Ushiku, T., Hino, R., Isogai, M., Ishikawa, S., Uozaki, H., Takada, K., and Fukayama, M. (2010). Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer research* *70*, 4719-4727.

Silver, S.J., Hagen, J.W., Okamura, K., Perrimon, N., and Lai, E.C. (2007). Functional screening identifies miR-315 as a potent activator of Wingless signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 18151-18156.

Singh, A., Shi, X., and Choi, K.W. (2006). Lobe and Serrate are required for cell survival during early eye development in *Drosophila*. *Development* *133*, 4771-4781.

Singh, A., Tare, M., Puli, O.R., and Kango-Singh, M. (2012). A glimpse into dorso-ventral patterning of the *Drosophila* eye. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *241*, 69-84.

Sokol, N.S., and Ambros, V. (2005). Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes & development* *19*, 2343-2354.

Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* *123*, 1133-1146.

Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P., and Tabata, T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Molecular cell* *5*, 59-71.

Theisen, H., Haerry, T.E., O'Connor, M.B., and Marsh, J.L. (1996). Developmental territories created by mutual antagonism between Wingless and Decapentaplegic. *Development* *122*, 3939-3948.

Treisman, J.E., and Rubin, G.M. (1995). wingless inhibits morphogenetic furrow movement in the *Drosophila* eye disc. *Development* *121*, 3519-3527.

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*, 141-153.

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. *Developmental biology* 306, 760-771.

Vallejo, D.M., Caparros, E., and Dominguez, M. (2011). Targeting Notch signalling by the conserved miR-8/200 microRNA family in development and cancer cells. *The EMBO journal* 30, 756-769.

Verras, M., and Sun, Z. (2006). Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. *Cancer letters* 237, 22-32.

Wienholds, E., Koudijs, M.J., van Eeden, F.J., Cuppen, E., and Plasterk, R.H. (2003). The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nature genetics* 35, 217-218.

Wienholds, E., and Plasterk, R.H. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS letters* 579, 5911-5922.

Wiklund, E.D., Bramsen, J.B., Hulf, T., Dyrskjot, L., Ramanathan, R., Hansen, T.B., Villadsen, S.B., Gao, S., Ostensfeld, M.S., Borre, M., *et al.* (2011). Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 128, 1327-1334.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11, 228-234.

Wodarz, A., and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology* 14, 59-88.

Wu, B., Crampton, S.P., and Hughes, C.C. (2007). Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26, 227-239.

Wu, J., and Cohen, S.M. (2002). Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* 129, 2411-2418.

Xu, D., Wang, Y., Willecke, R., Chen, Z., Ding, T., and Bergmann, A. (2006). The effector caspases drICE and dcp-1 have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in *Drosophila*. *Cell death and differentiation* *13*, 1697-1706.

Xu, P., Vernooy, S.Y., Guo, M., and Hay, B.A. (2003). The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current biology : CB* *13*, 790-795.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* *17*, 3011-3016.

Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis reviews* *28*, 15-33.

Yoffe, K.B., Manoukian, A.S., Wilder, E.L., Brand, A.H., and Perrimon, N. (1995). Evidence for engrailed-independent wingless autoregulation in *Drosophila*. *Developmental biology* *170*, 636-650.

Yu, S.Y., Yoo, S.J., Yang, L., Zapata, C., Srinivasan, A., Hay, B.A., and Baker, N.E. (2002). A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye. *Development* *129*, 3269-3278.

Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* *87*, 833-844.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., and Anderson, T.A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology* *302*, 1-12.

Zhao, Y., Samal, E., and Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* *436*, 214-220.

Zhao, Y., and Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends in biochemical sciences* *32*, 189-197.

圖表目錄

圖表

表 一、UAS-microRNA 轉殖果蠅株所包含之 microRNAs.....	70
表 二、透過 <i>ey-Gal4</i> 與 <i>GMR-Gal4</i> 篩選出眼睛變小之 microRNAs 列表	71
圖 一、 <i>mir-274</i> 表達於眼睛未分化細胞與正在分化視神經細胞皆會使果蠅成蟲 眼睛變小	72
圖 二、 <i>mir-274</i> 引發小眼表現型主因並非影響細胞凋亡或細胞增生	73
圖 三、表達 <i>mir-274</i> 於三齡幼蟲眼碟未分化細胞會引起細胞凋亡	75
圖 四、表達 <i>mir-274</i> 於三齡幼蟲眼碟未分化細胞會影響細胞增生	77
圖 五、 <i>mir-274</i> 於果蠅三齡幼蟲眼碟表現位置	79
圖 六、於三齡幼蟲眼碟未分化細胞表達 <i>mir-274</i> 會抑制調控眼睛發育的 <i>Eyeless</i> 及 <i>Notch</i> 訊息鏈並且促進負向調控眼睛發育 <i>Wingless</i> 訊息傳遞鏈.....	80
圖 七、表達 <i>mir-274</i> 會影響 <i>dpp</i> 訊息傳遞鏈但不抑制內生性 <i>upd</i> 表達	82
圖 八、 <i>mir-274</i> 透過轉錄轉譯層級在三齡幼蟲眼碟與翅碟中提高 <i>Wg</i> 表現並且 引發細胞移行	83
圖 九、表達 <i>mir-274</i> 同時降低 <i>wg</i> 劑量於三齡幼蟲眼碟與翅碟皆可抑制 <i>mir-274</i> 所引發細胞移行	86
圖 十、表達 <i>mir-274</i> 於三齡幼蟲翅碟會引發非自主性細胞凋亡，抑制細胞凋亡 可恢復 <i>mir-274</i> 所導致細胞移行表現型	88
圖 十一、 <i>mir-274</i> 於三齡幼蟲翅碟引起細胞移行會降低連接蛋白表現	91
圖 十二、 <i>mir-274</i> 表達於翅碟不同區域在三齡幼蟲翅碟皆會引起細胞移行	94

圖 十三、 <i>mir-274</i> 於三齡幼蟲翅碟引起細胞移行性狀會提高表皮細胞間質化標誌蛋白	96
圖 十四、表達 <i>mir-274</i> 於眼碟及翅碟會使 <i>puc-LacZ</i> 表現顯著上升	98
圖 十五、初步測試表達 <i>mir-274</i> 同時降低 <i>Axn</i> 劑量或補回 E-cadherin 於三齡幼蟲翅碟，可改變 <i>mir-274</i> 引發細胞骨架改變性狀	99
圖 十六、人類 <i>mir-758</i> 可能為果蠅 <i>mir-274</i> 同源微型核糖核酸	100
圖 十七、 <i>mir-274</i> 所導致小眼表現型可能的機制	101
圖 十八、 <i>mir-274</i> 所導致細胞凋亡與細胞移行可能的機制	102

附圖

附圖 一、 <i>mir-274</i> RNA 原位雜交實驗使用之質體	103
附圖 二、Wingless 訊息傳遞鏈的負向調控者： <i>APC</i> 與 <i>Axn</i> 可能為 <i>mir-274</i> 目標基因	104
附圖 三、以 TALEN 技術產生 <i>mir-274</i> 缺失果蠅株	105
附圖 四、篩選 <i>mir-274</i> 缺失果蠅株	106

50 miRNA lines (25 miRNAs)	
<i>UAS-let-7</i>	<i>UAS-mir-92a</i>
<i>UAS-bantam</i>	<i>UAS-mir-92b</i>
<i>UAS-mir-2a-1</i>	<i>UAS-mir-263a</i>
<i>UAS-mir-2a-2</i>	<i>UAS-mir-263b</i>
<i>UAS-mir-2c</i>	<i>UAS-mir-274</i>
<i>UAS-mir-3</i>	<i>UAS-mir-277</i>
<i>UAS-mir-4</i>	<i>UAS-mir-279</i>
<i>UAS-mir-6-1</i>	<i>UAS-mir-285</i>
<i>UAS-mir-6-2</i>	<i>UAS-mir-308</i>
<i>UAS-mir-6-3</i>	<i>UAS-mir-313</i>
<i>UAS-mir-7</i>	<i>UAS-mir-310-313</i>
<i>UAS-mir-13a</i>	<i>UAS-mir-2-13 cluster</i>
<i>UAS-mir-57</i>	

(from Dr. Chun-Hong Chen, NHRI)

表一: UAS-microRNA 轉殖果蠅株所包含之 microRNAs

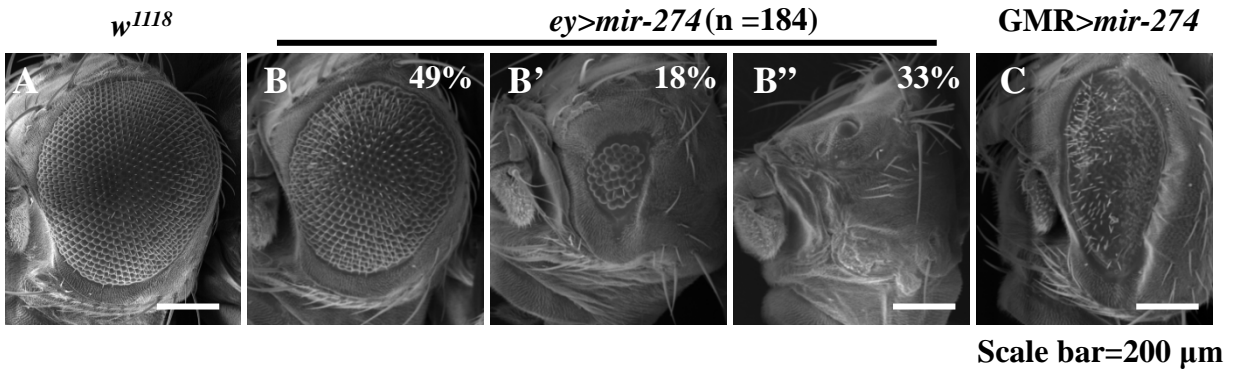
miRNA	<i>ey-GAL4</i>	<i>GMR-GAL4</i>
<i>miR-2a</i>	+	+
<i>miR-2-13 cluster</i>	++	++
<i>miR-13a</i>	+	+
<i>miR-263a</i>	+	-
<i>miR-263b</i>	++	black spot
<i>miR-274</i>	++	++
<i>let-7</i>	++	++
<i>miR-7</i>	+	-

(supported by Wan-Yu Lan and Su-Wen Cheng)

附註：

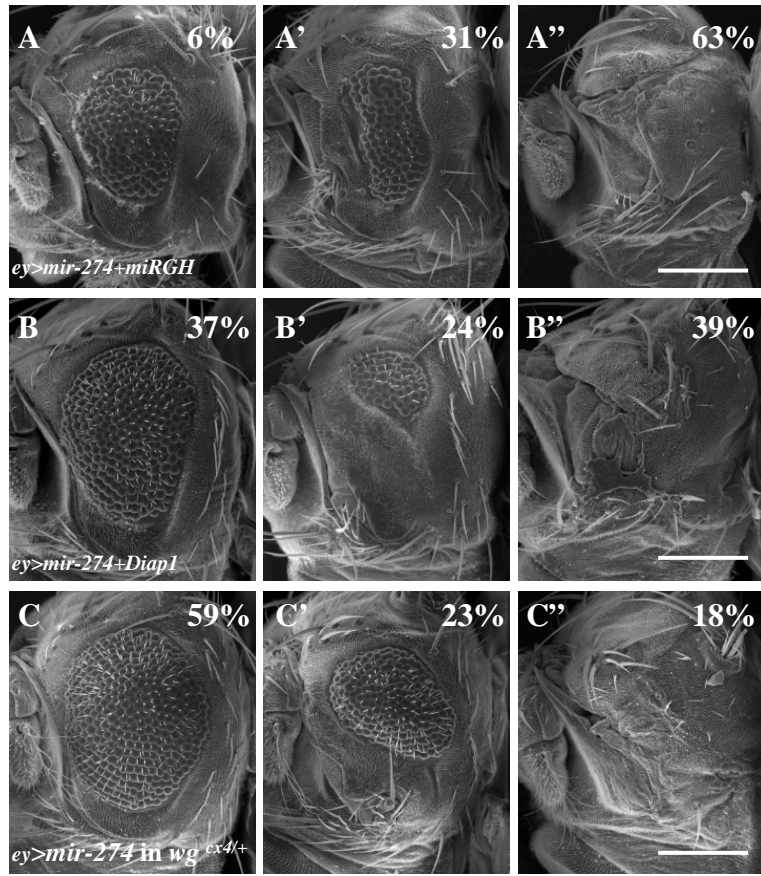
標示為”+”表示果蠅成蟲眼睛有變小，並以數目表示變小程度。
 標示為”-”表示果蠅成蟲眼睛大小與控制組相比無改變。

表二:透過*ey-Gal4*與*GMR-Gal4*篩選出眼睛變小之microRNAs列表

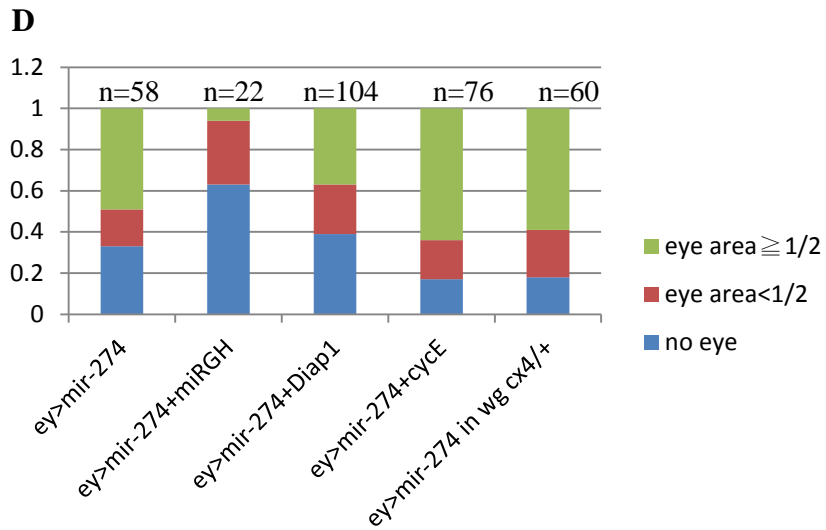


圖一: *mir-274*表達於眼睛未分化細胞與正在分化視神經細胞皆會使果蠅成蟲眼睛變小

(A-C)為掃描式電子顯微鏡拍攝之果蠅成蟲複眼結果。於果蠅未分化細胞(*ey-Gal4*)與正在分化視神經細胞(*GMR-Gal4*)大量表達*mir-274*，以下以*ey>mir-274*及*GMR>mir-274*表示。(A)為以野生型*w¹¹¹⁸*做為控制組。(B-B'')於眼碟中未分化細胞大量表達*mir-274* (*ey>mir-274*)可觀察到不同程度成蟲眼睛變小表現型，共計算184個眼睛，於圖片右上方標示比例。(B)*ey>mir-274*成蟲眼睛面積大於等於二分之一者，經計算約佔整體比例49%。(B')*ey>mir-274*成蟲眼睛面積小於二分之一者，經計算約佔整體比例18%。(B'')*ey>mir-274*成蟲眼睛完全沒有複眼者，經計算約佔整體比例33%。(C)於正在分化之視神經細胞表達*mir-274*(*GMR>mir-274*)也可觀察到小眼表現型，並且失去複眼原有構形呈光滑貌與眼睛後端剛毛缺失。



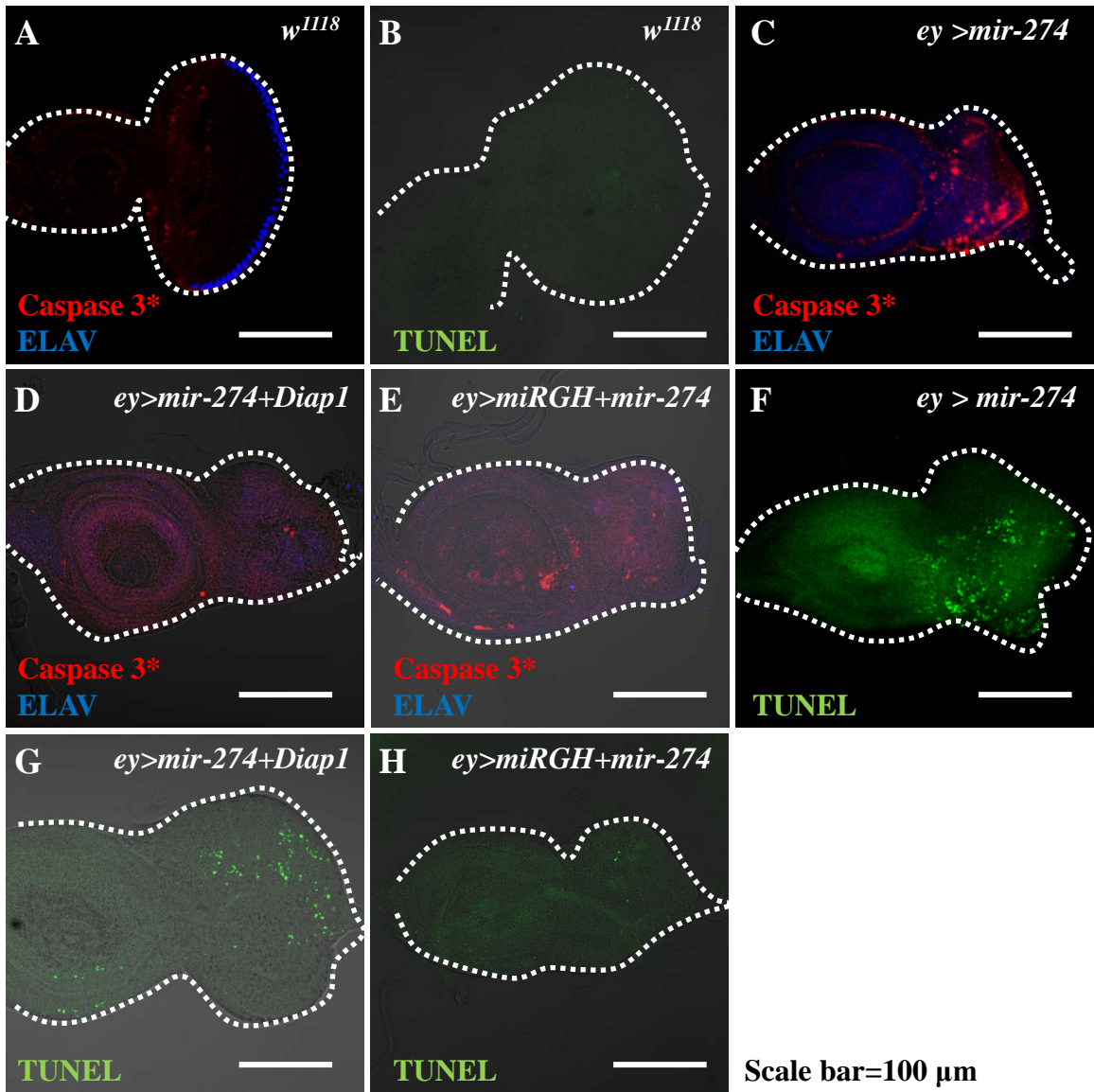
Scale bar=200 μ m



圖二: *mir-274*引發小眼表現型主因並非影響細胞凋亡或細胞增生

圖二: *mir-274*引發小眼表現型主因並非影響細胞凋亡或細胞增生

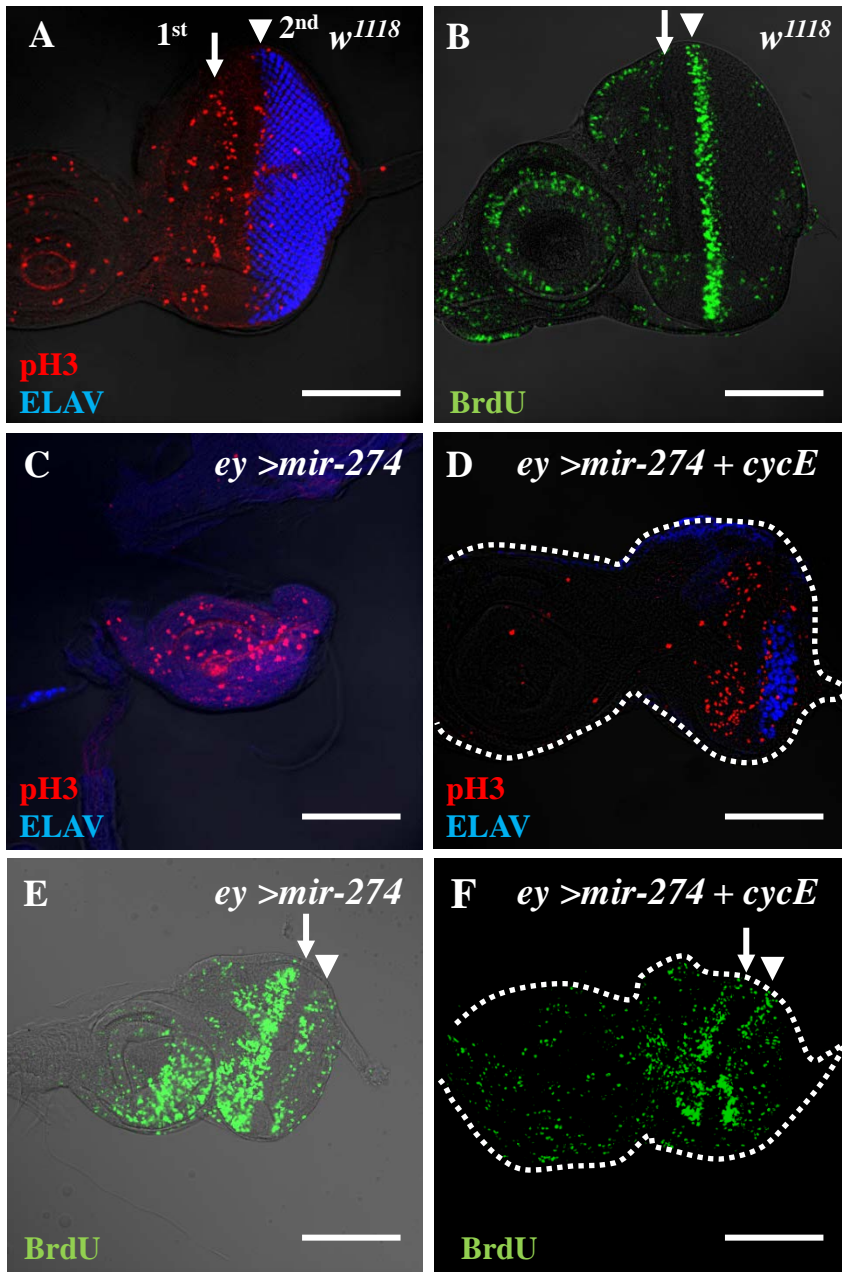
(A-D'')為掃描式電子顯微鏡拍攝之果蠅成蟲複眼結果。利用*ey-Gal4*表達*mir-274*同時抑制細胞凋亡、同時補回細胞週期重要調節蛋白*cycE*或同時降低*wg*劑量，觀察成蟲複眼大小是否改變。(A-A'')在*ey>mir-274*果蠅中同時表達可抑制細胞凋亡路徑最上游三基因的microRNA *miRGH(reaper、hid、grim)(ey>mir-274+miRGH)*，可觀察到不同程度成蟲眼睛變小表現型，共計算22個眼睛，於圖片右上方標示比例。(A)*ey>mir-274+miRGH*複眼面積大於等於二分之一者，經計算佔整體比例6%。(A')*ey>mir-274+miRGH*複眼面積小於二分之一者，經計算佔整體比例31%。(A'')*ey>mir-274+miRGH*完全沒有複眼者，經計算佔整體比例63%。(B-B'')*ey>mir-274*同時表達細胞凋亡路徑中的負向調控者*Diap1(ey>mir-274+Diap1)*成蟲複眼三種不同程度表現型，共計算104個眼睛。(B)表示*ey>mir-274+Diap1*複眼面積大於等於二分之一者，經計算佔整體比例37%。(B')表示*ey>mir-274+Diap1*複眼面積小於二分之一者，經計算佔整體比例24%。(B'')表示*ey>mir-274+Diap1*完全沒有複眼者，經計算佔整體比例39%。(C-C'')*ey>mir-274*同時藉由*wg^{cx4}*降低*wg*劑量(*ey>mir-274 in wg^{cx4/+}*)成蟲複眼三種不同程度表現型，共計算60個眼睛。(C)表示*ey>mir-274 in wg^{cx4/+}*複眼面積大於等於二分之一者，經計算佔整體比例59%。(C')表示*ey>mir-274 in wg^{cx4/+}*複眼面積小於二分之一者，經計算佔整體比例23%。(C'')表示*ey>mir-274 in wg^{cx4/+}*完全沒有複眼者，經計算佔整體比例18%。(D)為(A-C'')量化後圖表。



圖三: 表達 *mir-274* 於三齡幼蟲眼碟未分化細胞會引起細胞凋亡

圖三:表達 *mir-274*於三齡幼蟲眼碟未分化細胞會引起細胞凋亡

(A-J)為果蠅三齡幼蟲眼碟免疫螢光染色結果。於眼睛未分化細胞表達 *mir-274*(*ey>mir-274*)會導致小眼，為了解在眼碟發育過程中是否引發細胞凋亡，透過原位末端轉移酶標定技術(TUNEL assay)與偵測活化型細胞凋亡蛋白3 (activated -caspase 3)。野生型^{w¹¹¹⁸}果蠅三齡幼蟲眼碟以抗體標定活化態Caspase 3之結果(A)及透過TUNEL assay之結果(B)。果蠅三齡幼蟲眼碟僅有零星至幾乎沒有細胞凋亡的細胞。(C)在*ey>mir-274* 三齡幼蟲眼碟中透過抗體偵測活化態Caspase 3可發現細胞凋亡訊號。(D)於眼碟中表達*mir-274*時，同時利用細胞凋亡路徑中的負向調控者Diap1抑制細胞凋亡(*ey>mir-274+Diap1*) 可觀察細胞凋亡訊號下降，但不能恢復眼碟大小。(E)於表達*mir-274*背景下，透過miRGH抑制細胞凋亡，miRGH為抑制細胞凋亡路徑最上游三基因：*reaper*、*hid*、*grim* 的microRNA (*ey>mir-274+miRGH*)，可觀察細胞凋亡訊號消失，但無法恢復眼碟大小。(F) *ey>mir-274* 利用TUNEL assay可偵測到明顯細胞凋亡訊號。(G) *ey>mir-274+Diap1* 藉由TUNEL 偵測，可發現細胞凋亡訊號有減少。(H) *ey>mir-274+miRGH*透過TUNEL 偵測，可發現細胞凋亡訊號消失。(紅色螢光：活化態Caspase 3；藍色螢光：Elav，標示視神經細胞；綠色螢光：TUNEL訊號，標示細胞凋亡細胞)



Scale bar=100 μ m

圖四:表達 *mir-274* 於三齡幼蟲眼碟未分化細胞會影響細胞增生

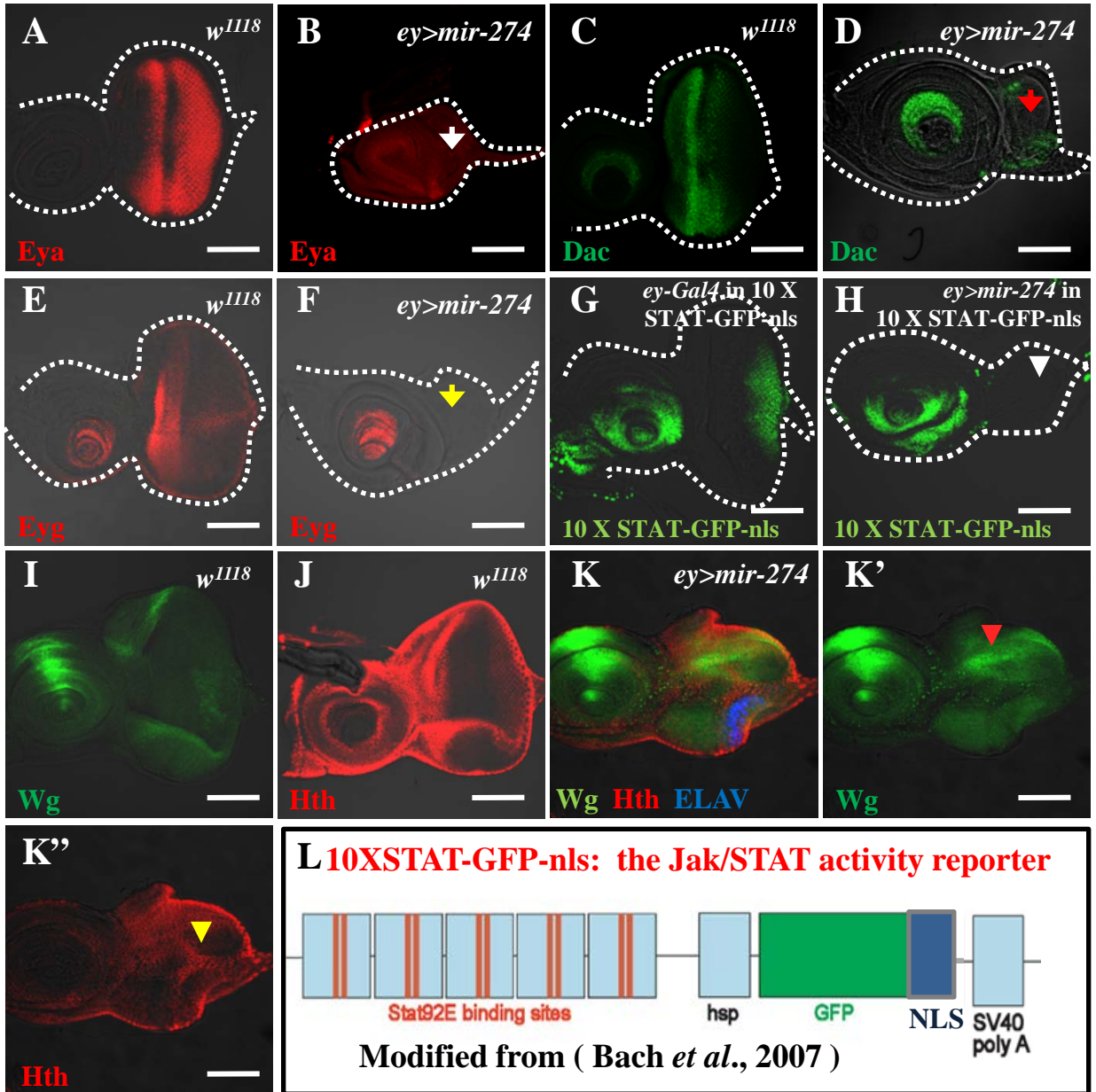
圖四:表達 *mir-274*於三齡幼蟲眼碟未分化細胞會影響細胞增生

(A-H)為果蠅三齡幼蟲眼碟免疫螢光染色結果，將*mir-274*表達於眼睛未分化(*ey>mir-274*)與正在分化之視神經細胞(*GMR>mir-274*)，觀察*mir-274*是否影響細胞增生，而導致其小眼表現型。(A)為野生型 w^{1118} 果蠅三齡幼蟲眼碟phospho-Histone 3(pH3)免疫染色，標示位於M phase細胞，可以看到有兩波同步化M phase 細胞，分別用白色箭號及箭頭標示稱為1st mitotic wave與2nd mitotic wave(紅色螢光)。ELAV標示視神經細胞(藍色螢光)。(B)為野生型 w^{1118} 果蠅三齡幼蟲眼碟BrdU染色，標定位於S phase細胞，用白色箭頭標示為2nd mitotic wave (綠色螢光)。(C) *ey>mir-274*可能因引發細胞凋亡使眼碟幾乎不見(圖三 C, F)，無法觀察到1st mitotic wave與2nd mitotic wave(紅色螢光)。(D) *ey>mir-274+cycE*可使眼碟部分恢復pH3訊號(紅色螢光)。(E) *ey>mir-274*於眼碟未分化部分位於S phase細胞有增多現象，但沒有2nd mitotic wave。(F) *ey>mir-274+cycE*可部分恢復眼碟大小，在BrdU訊號及pH3染色中可觀察到2nd mitotic wave 可產生。表達*cycE*可以部份恢復*ey>mir-274*小眼性狀。



圖五: *mir-274*於果蠅三齡幼蟲眼碟表現位置

果蠅三齡幼蟲眼碟，利用 *mir-274* 反向探針進行 RNA 原位雜交反應 (RNA *in situ* hybridization) 之實驗結果。為偵測內生性 *mir-274* 於三齡幼蟲眼碟表現之位置，以 *mir-274* 基因組 DNA 轉殖至 KS^+ 質體中作為模板，進行體外轉錄反應 (*in vitro* transcription)，以 DIG-UTP 標示 RNA，製作 *mir-274* 正向探針 (sense RNA probe) 與 *mir-274* 反向探針 (anti-sense probe)。(A) 利用 *GMR-Gal4* 於眼碟大量表達 *mir-274*，並以 *mir-274* 反向探針偵測 *mir-274* 表現測試探針專一性與作為正向控制組。在 *GMR>mir-274* 中，*mir-274* anti-sense 探針在型態生成凹溝 (morphogenetic furrow, MF) 後方可以專一性偵測到 *mir-274* 的表達。(B) 以 *mir-274* 正向探針結果作為負向控制組，並無偵測到訊號，表示 *mir-274* 反向探針有高度特異性。(C) *mir-274* 於野生型 w^{1118} 果蠅三齡幼蟲眼碟廣泛表達於眼碟中。(D) 透過 *mir-274* 正向探針偵測野生型 w^{1118} 果蠅三齡幼蟲眼碟，並無偵測到訊號。



Scale bar=100 μm

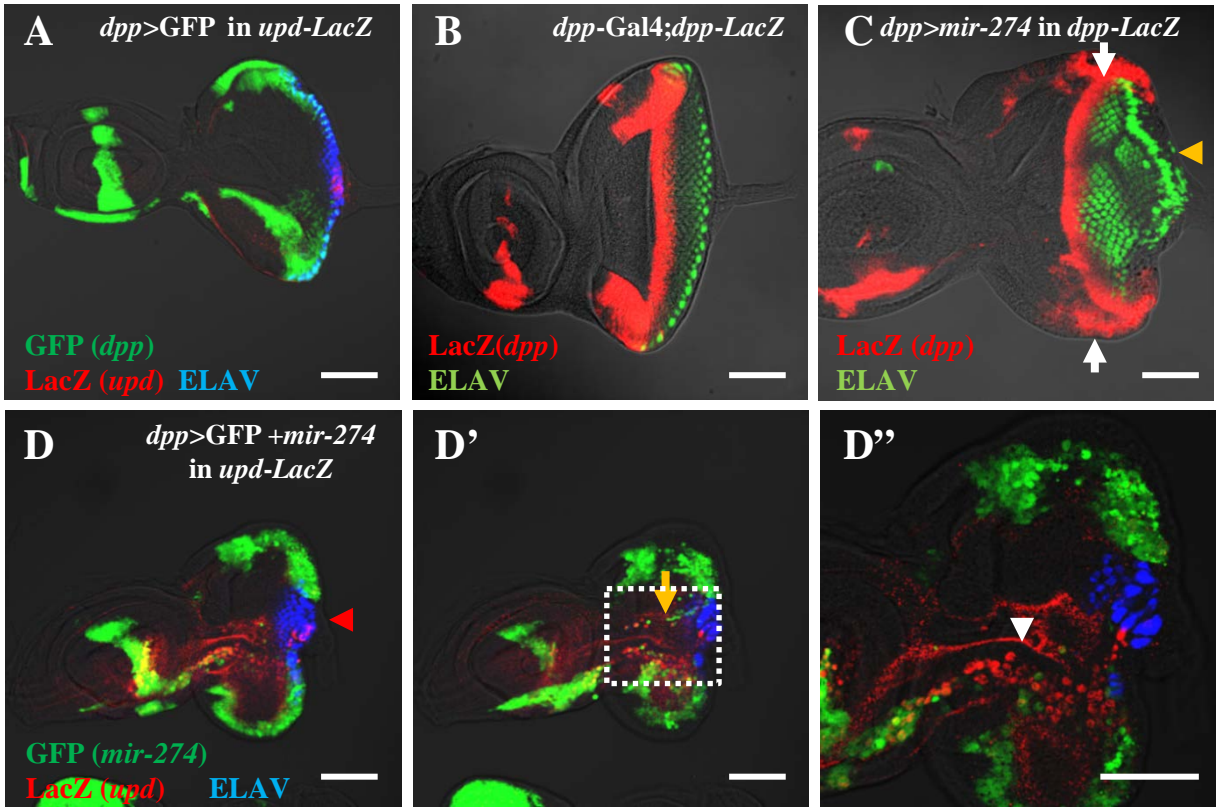
圖六:於三齡幼蟲眼碟未分化細胞表達*mir-274*會抑制調控眼睛發育的 Eyeless及Notch訊息鏈並且促進負向調控眼睛發育Wingless訊息傳遞鏈

圖六:於三齡幼蟲眼碟未分化細胞表達*mir-274*會抑制調控眼睛發育的

Eyeless及Notch訊息鏈並且促進負向調控眼睛發育Wingless訊息傳遞鏈

(A-K) 為果蠅三齡幼蟲眼碟免疫螢光染色結果。將*mir-274*表達於眼睛未分化細胞，觀察*mir-274*是否影響眼睛正向或負向調控眼睛發育基因。

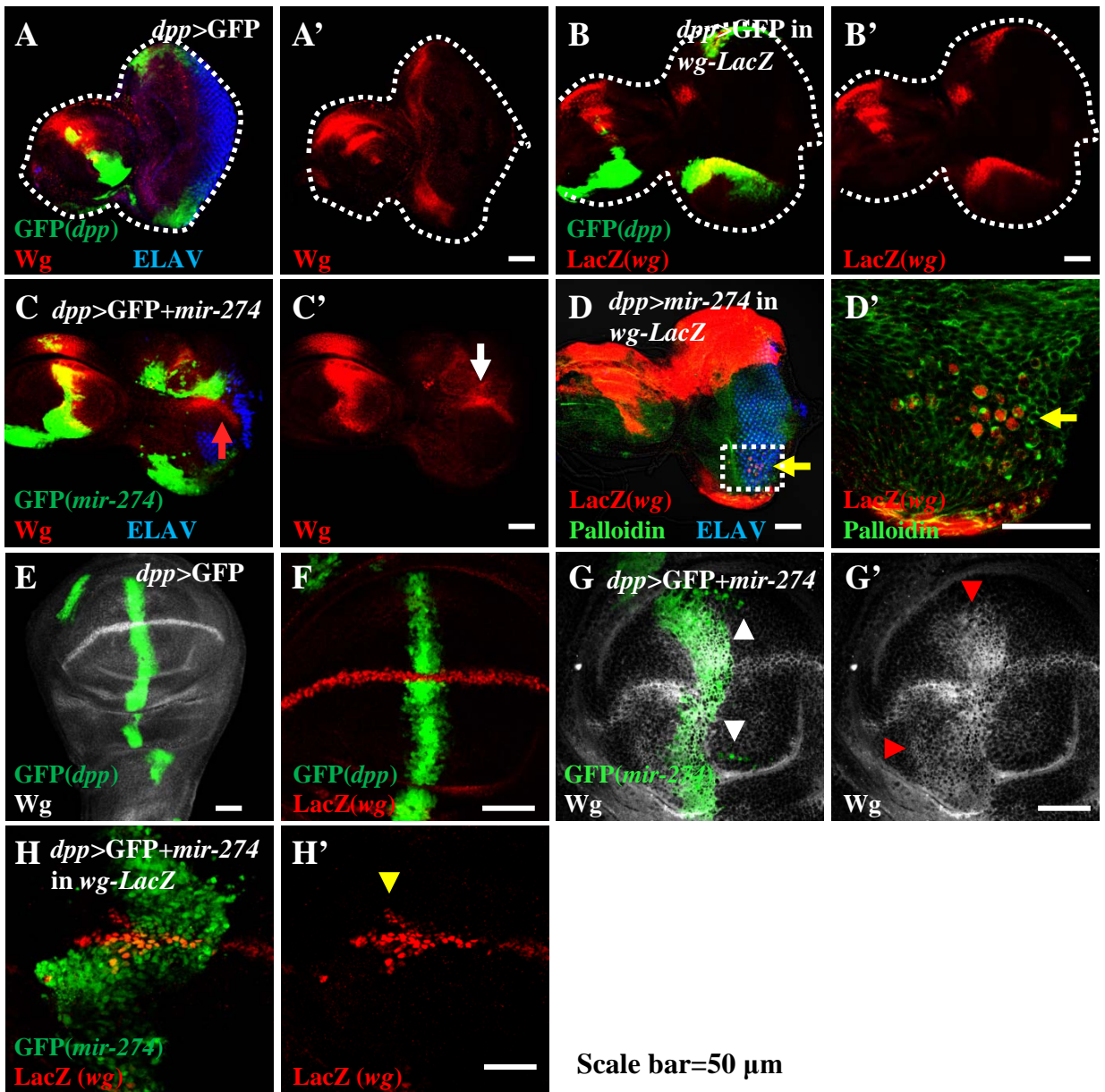
(A)為野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅眼碟，Eya表現於型態生成凹溝(morphogenetic furrow, MF)前至整個眼碟。(B)利用 *ey-Gal4*大量表達*mir-274*時會抑制Eya蛋白表達(白色箭號)。(C)為野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅眼碟，Dac表現於MF前後。(D)利用 *ey-Gal4*大量表達*mir-274*時，會抑制Dac蛋白表達(紅色箭號)。(E)為野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅眼碟，Eyg表現於眼碟中線。(F)*ey>mir-274*時會抑制Eyg蛋白表達(黃色箭號)。(G)10X STAT-GFP-nls報導基因於果蠅三齡眼碟表現型。10X STAT-GFP-nls報導基因可反應Jak/STAT訊息傳遞鏈活性。(H)透過10X STAT-GFP-nls報導基因觀察以*ey-Gal4*表達*mir-274*時，會降低Jak/STAT訊息傳遞鏈活性(白色箭頭)。(I)為野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅眼碟，Wg表現於果蠅眼碟邊緣兩側。(J)為野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅眼碟，Hth表現於區域一與二(domain I, II)。(K-K'')*ey>mir-274*會在眼碟內異位提高Wg與Hth蛋白表達。(K)*ey>mir-274*會於眼碟內部異位提高Wg與Hth蛋白表現(綠色螢光：Wg；紅色螢光：Hth；藍色螢光：ELAV，標示視神經細胞)。(K')*ey>mir-274*會於眼碟內部異位提高Wg蛋白表現(紅色箭頭)。(K'')*ey>mir-274*會於眼碟內部異位提高Wg下游Hth蛋白表現(黃色箭頭)。(L)10X STAT-GFP-nls報導基因示意圖。10X STAT-GFP報告基因含有10個STAT92E結合位且融合GFP螢光蛋白，當STAT活化後進核，則可與此結合位結合，使GFP螢光蛋白可以表達，藉由觀察GFP蛋白表現，反應Jak/STAT訊息傳遞鏈活性。(Bach *et al.*, 2007)在我們實驗室中將10X STAT-GFP的GFP報告基因加上nls序列，使GFP可以進核幫助觀察。



Scale bar=50 μ m

圖七：表達mir-274會影響dpp訊息傳遞鏈但不抑制內生性upd表達

(A-D'')為果蠅三齡幼蟲眼碟免疫螢光染色結果，使用*dpp-Gal4*表達*mir-274*於眼碟兩側，觀察*dpp*與*upd*的表達是否有受到*mir-274*影響。(A)為果蠅三齡幼蟲眼碟利用UAS-GFP標定*dpp-Gal4*所表達之位置(綠色螢光)，以*upd-LacZ*標示*upd*表達區域(紅色螢光)，Elav標示視神經細胞(藍色螢光)。(B)三齡幼蟲眼碟*dpp*表達區域(紅色螢光)。Elav標示視神經細胞(綠色螢光)。(C)利用*dpp-Gal4*表達*mir-274*發現視神經細胞發育受到抑制(綠色螢光，黃色箭頭所指)。並且*dpp*訊號並未隨著型態生成凹溝(morphogenetic furrow, MF)一起前進有延遲於眼碟邊緣的現象(白色箭號)。(D-D'')於果蠅三齡幼蟲眼碟，利用*dpp-Gal4*表達*mir-274*及GFP，藉由GFP標定*mir-274*所表達之細胞，利用*upd-LacZ*觀察*upd*的表達。(D)利用*dpp-Gal4*表達*mir-274*發現視神經細胞發育受到*mir-274*抑制(藍色螢光，紅色箭頭所指)。(D')在*dpp>GFP+mir-274*中，表達*mir-274*之細胞會移行離開眼碟邊緣，有細胞移行表現型。(黃色箭號所指) (D'')為(D')白框放大處，可觀察到表達*mir-274*並不會抑制*upd-LacZ*表達，*mir-274*會促使*upd-LacZ*表達細胞非自主性細胞移行。(upd-LacZ，紅色螢光，白色箭頭所指)



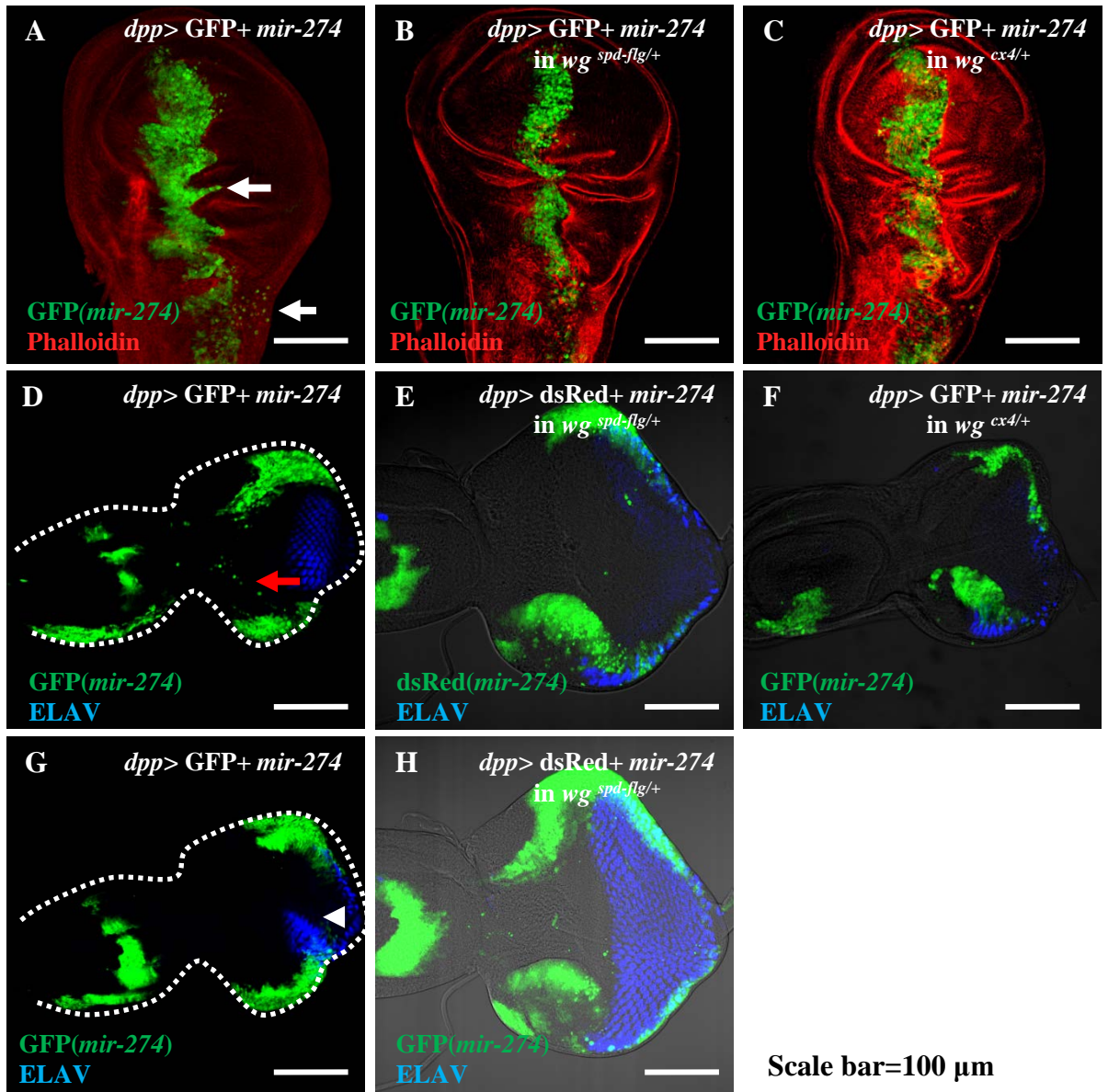
圖八: *mir-274*透過轉錄轉譯層級在三齡幼蟲眼碟與翅碟中提高Wg表現並且引發細胞移行

圖八: *mir-274*透過轉錄轉譯層級在三齡幼蟲眼碟與翅碟中提高Wg表現並且引發細胞移行

(A-H') 為果蠅三齡幼蟲眼碟與翅碟組織螢光免疫染色結果。在 *dpp>GFP+mir-274* 果蠅中，透過GFP標定 *mir-274* 表達細胞，於三齡幼蟲時期眼碟與翅碟表達 *mir-274* 觀察Wg表現。利用Wg抗體與 *wg-LacZ* 分別於轉錄及轉譯層級偵測 *mir-274* 是否會提高Wg表現量。(A-A') 為 *dpp>GFP* 三齡幼蟲眼碟Wg抗體組織免疫螢光染色結果。(A) *dpp>GFP* 眼碟透過Wg抗體染色，Wg蛋白表達於眼碟兩側(紅色螢光)，GFP標示 *dpp* 表達細胞(綠色螢光)，ELAV標示視神經細胞(藍色螢光)。(A') 為(A)單獨呈現Wg蛋白免疫染色結果(紅色螢光)。(B-B') 為 *dpp>GFP* 三齡幼蟲眼碟藉由 *wg-LacZ* 偵測內生性 *wg* 表達。(B) *dpp>GFP* 眼碟，*wg-lacZ* 表達於眼碟兩側(紅色螢光)，GFP標示 *dpp* 表達細胞(綠色螢光)。(B') 為(B)只呈現 *wg-LacZ* 表達結果(紅色螢光)。(C-C') 為 *dpp>GFP+mir-274* 三齡幼蟲眼碟Wg抗體組織免疫螢光染色結果。(C) *dpp>GFP+mir-274* 眼碟發現於眼碟邊緣表達 *mir-274*，會在眼碟內部異位提高Wg蛋白表現(紅色螢光)，且導致視神經發育受到抑制(ELAV，藍色螢光，紅色箭號)。(C') 為(C)單獨顯示Wg抗體染色部分，可看到Wg蛋白在眼碟中間異位表達(紅色，白色箭號)。(D-D') 為 *dpp>GFP+mir-274* 於三齡幼蟲眼碟，利用 *wg-LacZ* 偵測 *mir-274* 是否於轉錄層級影響 *wg* 表現。(D) *dpp>mir-274* 眼碟，表達 *mir-274* 促使 *wg-LacZ* 異位表達於眼碟內部(紅色螢光，黃色箭號)。(D') 為(D)圖白框處放大顯示 *wg-LacZ* 染色部分，可看到 *wg-LacZ* 異位表達於眼碟內部(紅色，黃色箭號)。(E) *dpp>GFP* 於果蠅三齡幼蟲翅碟，透過Wg抗體染色，Wg蛋白表達於背腹面交界處(D-V boundary)(白色)，GFP標示 *dpp* 表達細胞(綠色螢光)。(F) *dpp>GFP* 於果蠅三齡幼蟲翅碟，透過 *wg-LacZ* 偵測內生性 *wg* 表現，*wg-LacZ* 表達於背腹面交界處(紅色螢光)，GFP標示 *dpp* 表達細胞(綠色螢光)。

圖八：*mir-274*透過轉錄轉譯層級在三齡幼蟲眼碟與翅碟中提高Wg表現並且引發細胞移行

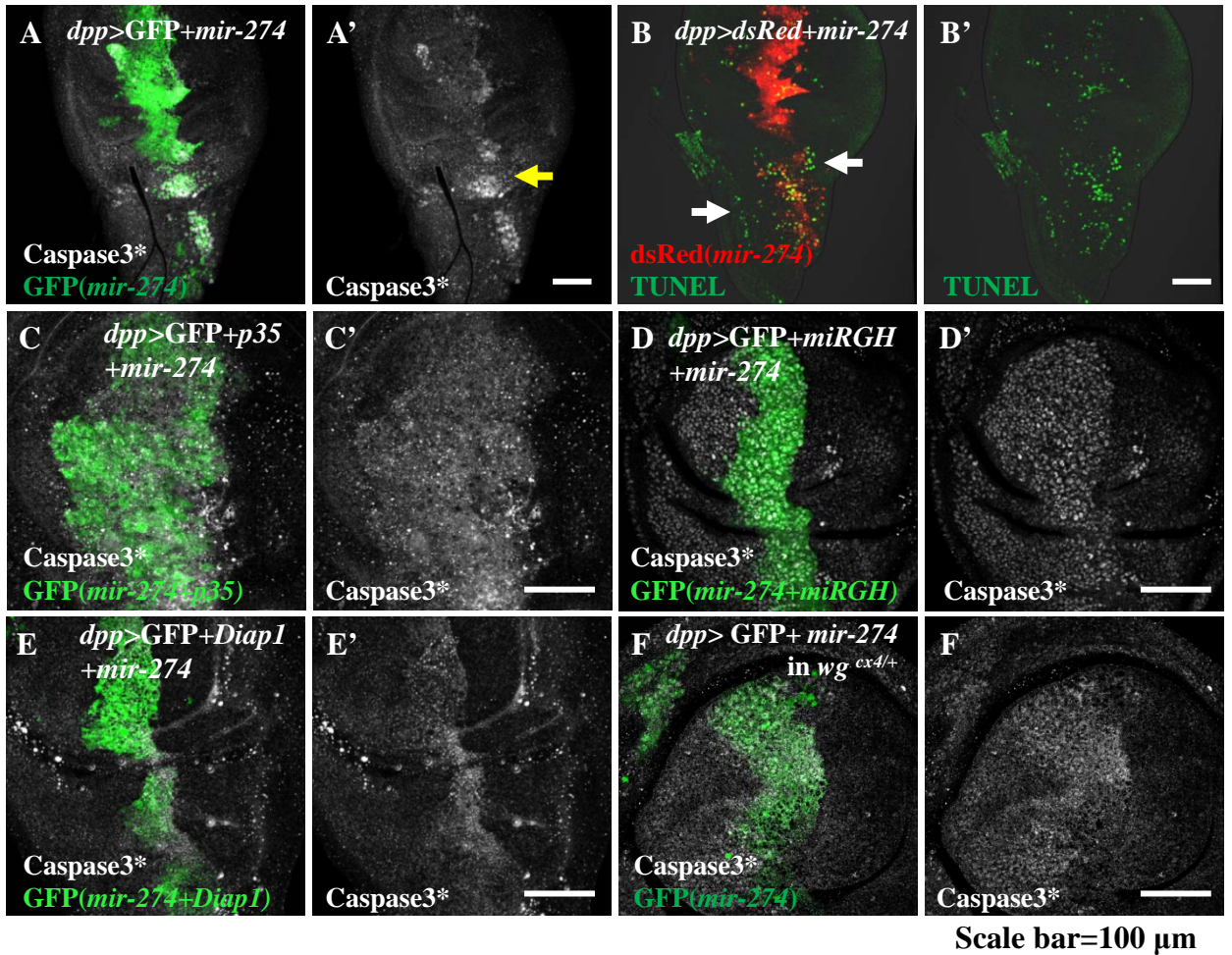
(G-G') 為 *dpp>GFP+mir-274* 三齡幼蟲翅碟 Wg 抗體組織免疫螢光染色結果。(G) *dpp>GFP+mir-274* 翅碟觀察到，透過 GFP 標定 *mir-274* 表達細胞，於翅碟中線表達 *mir-274* 細胞會提高 Wg 蛋白表現(白色)，且會有細胞移行表現型(綠色螢光，白色箭頭)。(G') 為 (G) 只顯示 Wg 抗體染色部分，可觀察到於翅碟表達 *mir-274* 會提高 Wg 蛋白表現並且為非自主性(non-autonomous) (白色，紅色箭頭)。(H-H') *dpp>GFP+mir-274* 三齡幼蟲翅碟，藉由 *wg-LacZ* 偵測內生性 *wg* 表達。(H) *dpp>GFP+mir-274* 翅碟，表達 *mir-274* 於翅碟中線可觀察到 *wg-LacZ* 異位表達於翅碟中(紅色螢光)。(H') 為 (H) 只顯示 *wg-LacZ* 染色部分，可看到 *wg-LacZ* 異位表達於翅碟中(紅色，黃色箭頭)。



圖九：表達*mir-274*同時降低*wg*劑量於三齡幼蟲眼碟與翅碟皆可抑制*mir-274*所引發細胞移行

圖九：表達*mir-274*同時降低*wg*劑量於三齡幼蟲眼碟與翅碟皆可抑制*mir-274*所引發細胞移行

(A-H)果蠅三齡幼蟲眼碟與翅碟組織免疫染色結果。利用*dpp-Gal4*表達*mir-274*與GFP(*dpp>GFP+mir-274*)，同時透過兩個不同*wg*突變株：*wg^{spd-flg}*與*wg^{CX4}*來降低*wg*劑量，利用GFP標示*mir-274*表達細胞，觀察*mir-274*所引發細胞移行性狀於眼碟及翅碟中是否會被影響。(A)*dpp>GFP+mir-274*於三齡幼蟲翅碟，可觀察到GFP所標定*mir-274*細胞遠離翅碟中線*dpp-Gal4*表達區域，有細胞移行性狀(綠色螢光，白色箭號)。(B)*dpp>GFP+mir-274*同時藉由*wg^{spd-flg}*降低*wg*劑量於三齡幼蟲翅碟中，可發現GFP所標定*mir-274*表達細胞的細胞移行受到抑制。(C) *dpp>GFP+mir-274*同時藉由*wg^{CX4}*降低*wg*劑量於翅碟中，可發現GFP所標定*mir-274*表達細胞的細胞移行受到抑制。(D) *dpp>GFP+mir-274*於三齡幼蟲眼碟中，可觀察到GFP所標定*mir-274*細胞遠離眼碟邊緣*dpp-Gal4*表達區域，*mir-274*表達細胞移動至眼碟中有細胞移行性狀(綠色螢光，紅色箭號)。(E) *dpp>GFP+mir-274*同時藉由*wg^{spd-flg}*降低*wg*劑量於三齡幼蟲眼碟中，發現可抑制*mir-274*所引發細胞移行表現型。(F) *dpp>GFP+mir-274*同時藉由*wg^{CX4}*降低*wg*劑量於眼碟中，可抑制*mir-274*所引發細胞移行表現型。(G) 為(D)不同焦平面(Focal Plane)結果，可觀察到眼碟變小，視神經細胞發育有缺陷(ELAV，藍色螢光，白色箭頭)。(H)為(E)不同焦平面(Focal Plane)結果，發現表達*mir-274*同時降低*wg*劑量，可恢復眼碟大小與視神經發育缺陷(ELAV，藍色螢光)。(紅色螢光：Phalloidin，標示F-actin；藍色螢光：ELAV，標示視神經細胞；綠色螢光：利用GFP所標示*mir-274*表達細胞)。



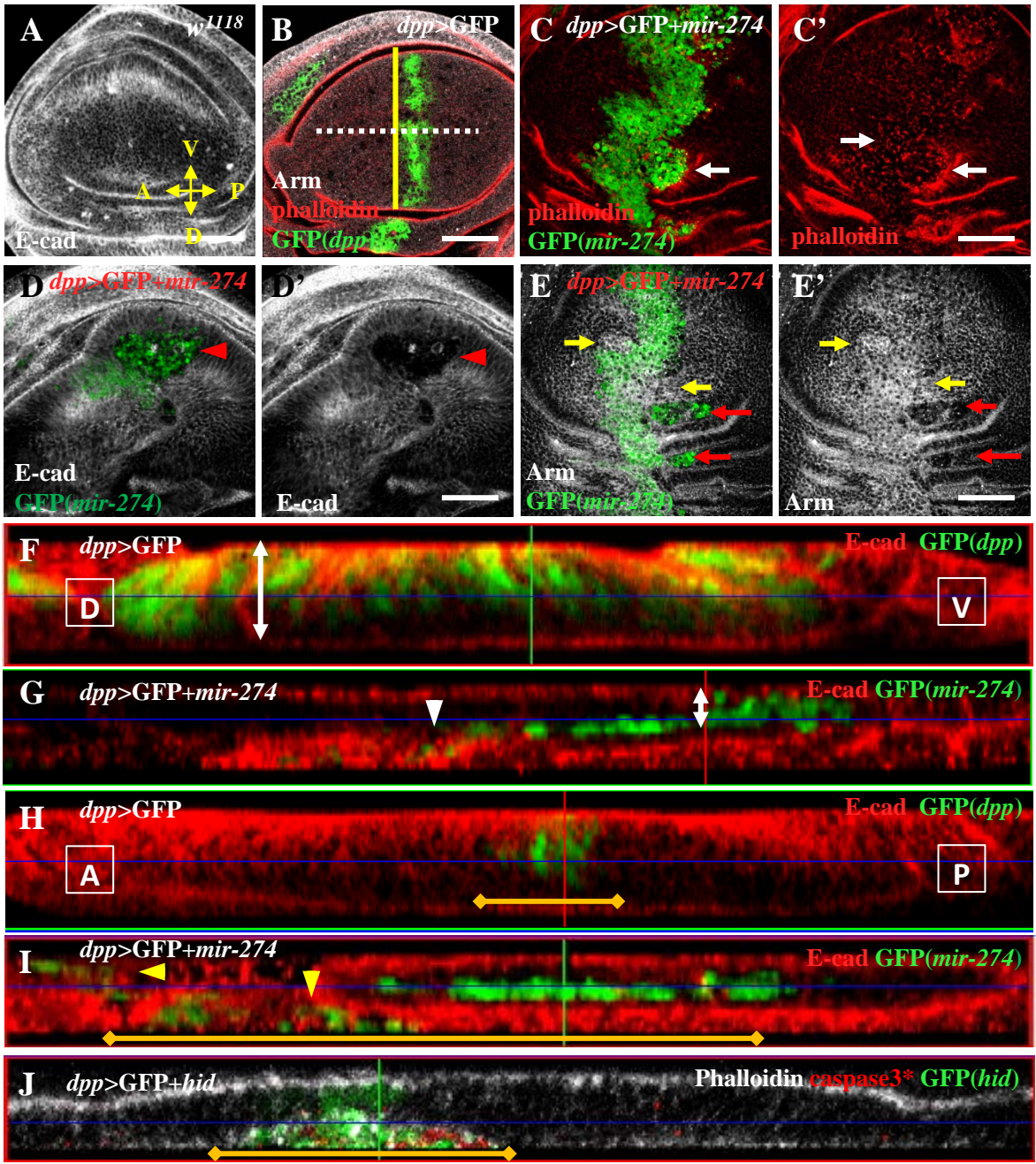
圖十：表達*mir-274*於三齡幼蟲翅碟會引發非自主性細胞凋亡，抑制細胞凋亡可恢復*mir-274*所導致細胞移行表現型

圖十: 表達*mir-274*會引發非自主性細胞凋亡, 抑制細胞凋亡可恢復*mir-274*所導致細胞移行表現型

(A-F')果蠅三齡幼蟲翅碟組織免疫染色結果。利用*dpp-Gal4*表達*mir-274*於翅碟前後端中線, 藉由GFP或*dsRed*標定*mir-274*表達細胞(*dpp>GFP+mir-274*; *dpp>dsRed+mir-274*), 同時透過*p35*、microRNA抑制細胞凋亡路徑最上游三基因: *reaper*、*hid*、*grim*(*miRGH*)與細胞凋亡路徑中的負向調控者*Diap1*, 來抑制細胞凋亡路徑, 觀察*mir-274*所引發細胞移行是否有受到影響。並且同時透過檢測活化態Caspase 3, 偵測細胞凋亡訊號。(A-A')*dpp>GFP+mir-274*於三齡幼蟲翅碟中, 透過組織染色活化態Caspase 3偵測細胞凋亡訊號結果。(A) *dpp>GFP+mir-274*於翅碟中, 可發現GFP標示*mir-274*表達細胞有活化態Caspase 3訊號(白色)。(A')為(A)單獨呈現活化態Caspase 3抗體染色結果(白色, 黃色箭號)。(B-B')*dpp>dsRed+mir-274*於三齡幼蟲翅碟中, 透過原位末端轉移酶標定技術(TUNEL assay)偵測細胞凋亡訊號結果。(B) *dpp>dsRed+mir-274*於翅碟中, 可發現*dsRed*標示*mir-274*表達細胞偵測細胞凋亡訊號(綠色螢光), 並且除了*dsRed*所標示細胞外其他區域也有細胞凋亡訊號, *mir-274*所引發細胞凋亡為非自主性(non-autonomous)(白色箭號)。(B')為(B)單獨呈現TUNEL染色結果(綠色螢光)。(C-C') *dpp>GFP+p35+mir-274*於三齡幼蟲翅碟中, 利用GFP標定*mir-274*表達細胞, 觀察細胞移行是否受到抑制。同時透過組織染色活化態Caspase 3偵測細胞凋亡訊號。(C) *dpp>GFP+p35+mir-274*翅碟中, 可發現*mir-274*所導致細胞移行性狀受到抑制, 但GFP訊號細胞變多(綠色螢光)。(C')為(C)單獨呈現活化態Caspase 3染色結果, 可發現活化態Caspase 3訊號並未到抑制, 反而變更多且為細碎點狀訊號(白色)。(D-D') *dpp>GFP+miRGH+mir-274*於三齡幼蟲翅碟中, 利用GFP標定*mir-274*表達細胞, 觀察細胞移行是否受到抑制。同時利用活化態Caspase 3抗體偵測細胞凋亡訊號。

圖十: 表達*mir-274*會引發非自主性細胞凋亡, 抑制細胞凋亡可恢復*mir-274*所導致細胞移行表現型

(D) *dpp>GFP+miRGH+mir-274*於翅碟中, 可發現*mir-274*所導致細胞移行性狀受到抑制(綠色螢光)。(D')為(D)單獨呈現活化態Caspase 3染色結果, 可發現活化態Caspase 3訊號並未受到抑制, 反而變更多(白色)。(E-E') *dpp>GFP+Diap1+mir-274*於三齡幼蟲翅碟中, 利用GFP標定*mir-274*表達細胞, 觀察細胞移行是否受到抑制。同時透過組織染色活化態Caspase 3偵測細胞凋亡訊號。(E) *dpp>GFP+Diap1+mir-274*於翅碟中, 可發現*mir-274*所導致細胞移行性狀受到抑制(綠色螢光)。(E')為(E)單獨呈現活化態Caspase 3染色結果, 可發現活化態Caspase 3訊號並未受到抑制, 但有變少且細碎點狀訊號(白色)。(F-F') *dpp>GFP+mir-274*透過*wg^{CX4}*降低*wg*劑量 (*dpp>GFP+mir-274* in *wg^{CX4/+}*)於三齡幼蟲翅碟, 利用GFP標定*mir-274*表達細胞, 觀察細胞移行是否受到抑制。同時透過活化態Caspase 3抗體偵測細胞凋亡訊號。(F) *dpp>GFP+mir-274* in *wg^{CX4/+}*於翅碟中, 觀察到*mir-274*引發的細胞移行受到抑制(綠色螢光)。(F')為只呈現(F)圖活化態Caspase 3染色結果, 顯示活化態Caspase 3訊號並未減少。



scale bar=50 μ m

圖十一: *mir-274*於三齡幼蟲翅碟引起細胞移行會降低連接蛋白表現

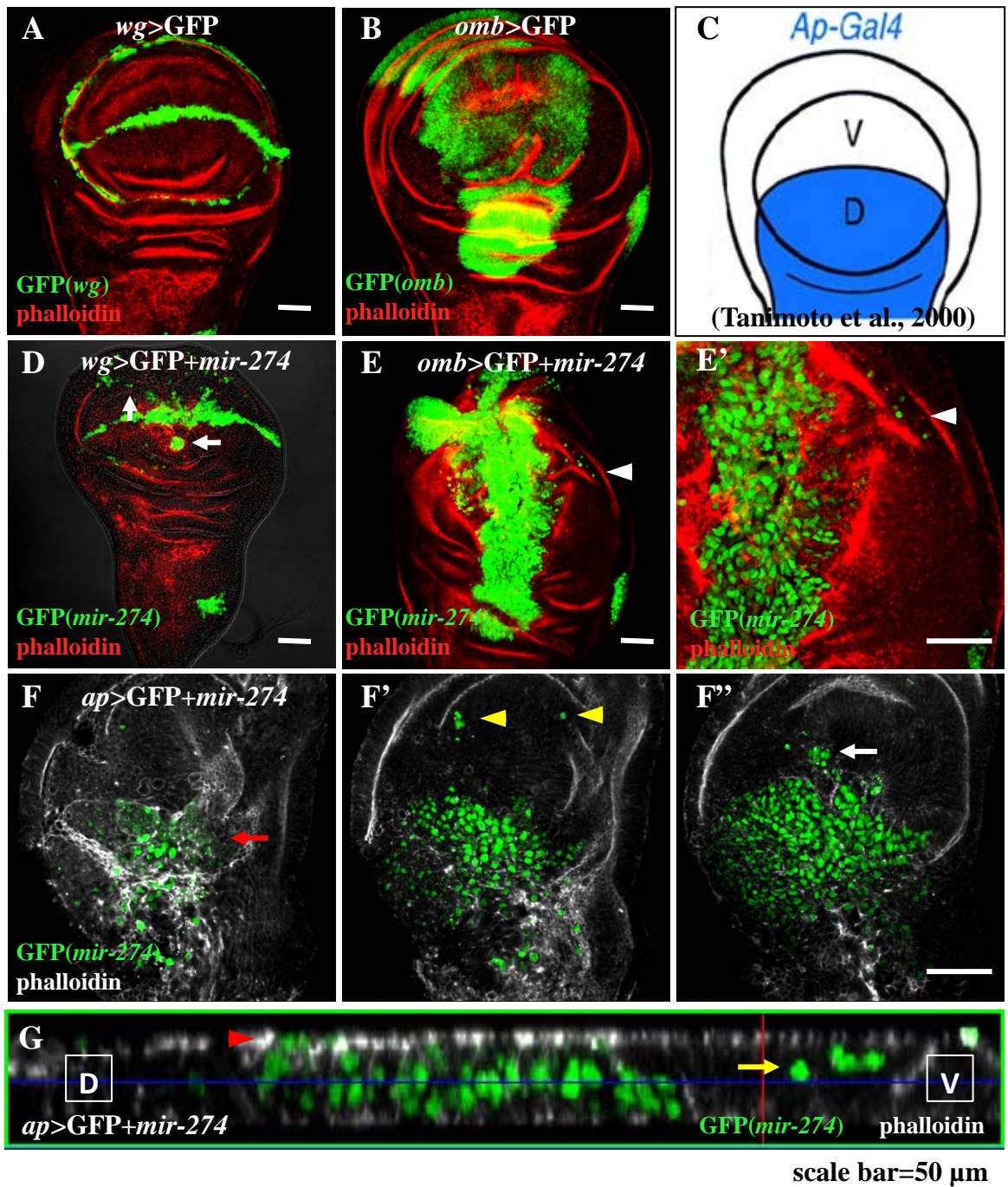
圖十一: *mir-274*於三齡幼蟲翅碟引起之細胞移行會降低連接蛋白表現

(A-H)為果蠅三齡幼蟲翅碟組織免疫螢光染色結果。利用 *dpp-Gal4* 同時表達 *mir-274* 與 GFP 於翅碟前後端交界處 (A-P boundary)，利用 GFP 標定 *mir-274* 所表達之細胞，觀察 *mir-274* 表達細胞是否改變連接蛋白表現或是影響細胞極性與細胞骨架構型。(A) 為 *w¹¹¹⁸* 果蠅三齡幼蟲翅碟，E-cadherin 廣泛表現於翅碟中。(B) 為 *dpp>GFP* 三齡幼蟲翅碟 β -Catenin (Armadillo, Arm; 白色)，Phalloidin (F-actin) 表現 (紅色螢光) 與 *dpp* 表現區域 (綠色螢光)。(C-C') *dpp>GFP+mir-274* 三齡幼蟲翅碟透過螢光標定 phalloidin 觀察 F-actin 是否有受到影響。(C) *dpp>GFP+mir-274* 翅碟發現 F-actin 有聚集與變成點狀現象 (紅色螢光，白色箭號)。(C') 為 (C) 只呈現 phalloidin 訊號，可觀察 F-actin 於翅碟中有異常聚集與成點狀性狀 (紅色螢光，白色箭號)。(D-D') *dpp>GFP+mir-274* 三齡幼蟲翅碟，藉由組織免疫螢光染色觀察 E-cadherin 是否有受到影響。(D) *dpp>GFP+mir-274* 翅碟觀察到 E-cadherin 被抑制 (白色，紅色箭頭)。(D') 為 (D) 只顯示 E-cadherin 抗體染色訊號，可觀察到表達 *mir-274* 細胞區域 (綠色螢光) E-cadherin 被抑制 (白色，紅色箭頭)。(E-E') *dpp>GFP+mir-274* 三齡幼蟲翅碟，藉由組織免疫螢光染色觀察 β -Catenin (Armadillo, Arm) 是否有受到影響。(E) *dpp>GFP+mir-274* 翅碟觀察到，表達 *mir-274* 細胞類似侵襲 (invasion) 區域 (綠色螢光，紅色箭號) β -Catenin (Arm) 被抑制 (白色)。另一區域 *mir-274* 表達細胞有些微增加 β -Catenin 訊號 (白色，黃色箭號)。(E') 為 (E) 單獨顯示 β -Catenin (Arm) 抗體染色結果，黃色箭號指出 β -Catenin 增加區域，紅色箭號指出 β -Catenin 降低區域。

圖十一:mir-274於三齡幼蟲翅碟引起之細胞移行會降低連接蛋白表現

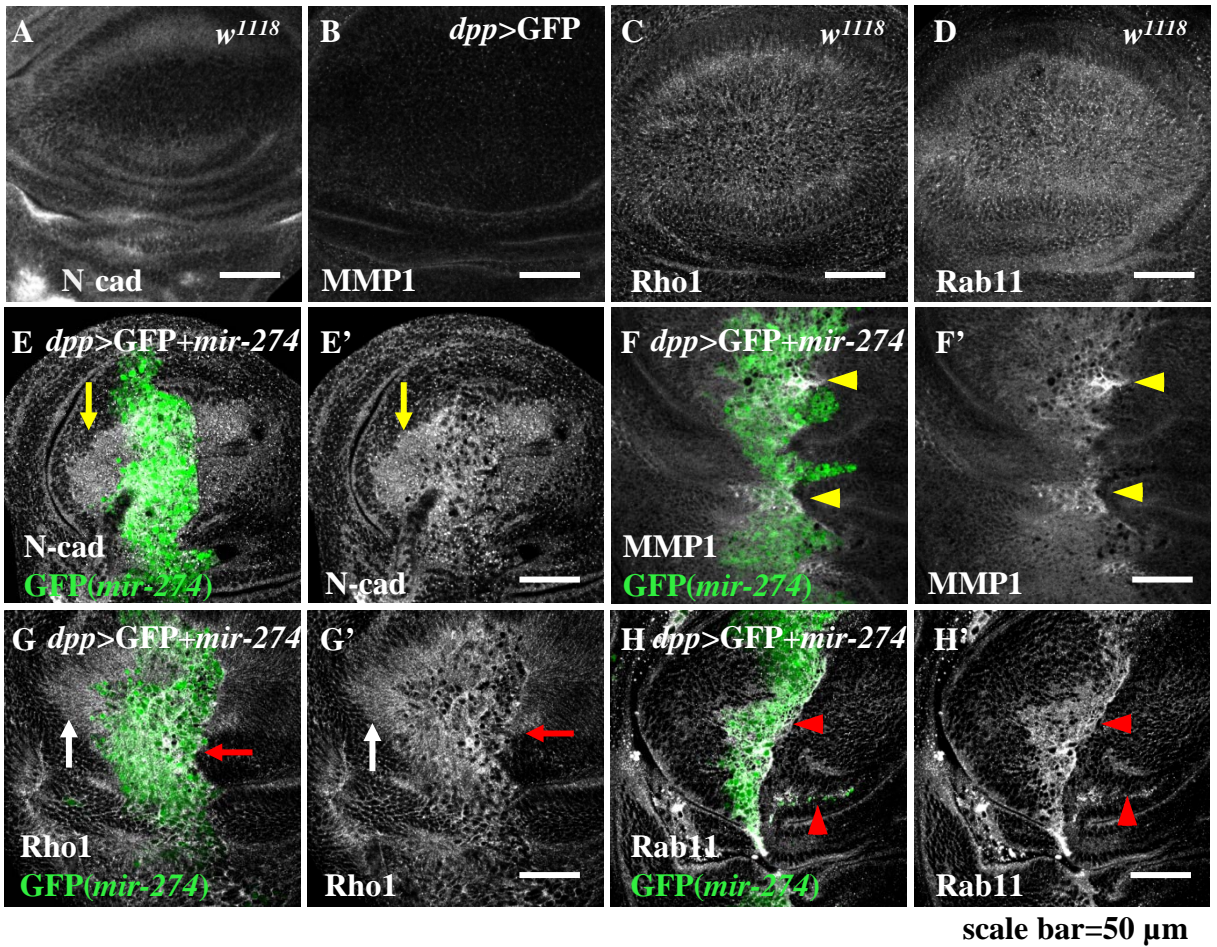
(F-G)為果蠅三齡幼蟲翅碟透過共軛焦顯微鏡掃描Z軸疊圖後背腹端切面圖，如圖(B)黃線標示處切面。左側為背面(dorsal, D)，右側為腹面(ventral, V)，上方為頂端(apical)，下方為基層(basal)。(F) *dpp*>GFP翅碟後背腹端切面圖，GFP標定*dpp*表達細胞，GFP標定細胞成柱狀整齊排列靠向頂端(apical)。(E-cadherin，紅色螢光) (G) *dpp*>GFP+*mir-274*翅碟，可觀察到GFP標定*mir-274*表達細胞，GFP標定細胞變圓失去柱狀結構，並遠離頂端往基層移動(綠色螢光，白色箭頭)。(E-cadherin，紅色螢光)

(H-J)為果蠅三齡幼蟲翅碟利用共軛焦顯微鏡掃描Z軸疊圖後前後端切面圖，如圖(B)白色虛線標示處切面。左側為前端(anterior, A)，右側為後端(posterior, P)，上方為頂端(apical)，下方為基層(basal)。(H) *dpp*>GFP翅碟，用GFP標定*dpp*表達細胞，GFP標定細胞成柱狀整齊排列於前後端中線區域，並靠向頂端(apical)。(E-cadherin，紅色螢光) (I) *dpp*>GFP+*mir-274*翅碟，可觀察到GFP標定*mir-274*表達細胞，GFP標定細胞變圓失去柱狀結構，並往前後端兩側分布，或是遠離頂端往基層移動，甚至移動至頂端其他區域(綠色螢光，黃色箭頭)。(E-cadherin，紅色螢光) (J)在*dpp*>GFP+*hid*翅碟，用GFP標定*hid*表達細胞，GFP標定細胞會引發細胞凋亡(活化態Caspase 3，紅色螢光)，且往基層移動(綠色螢光)。



圖十二: *mir-274* 表達於翅碟不同區域在三齡幼蟲翅碟皆會引起細胞移行

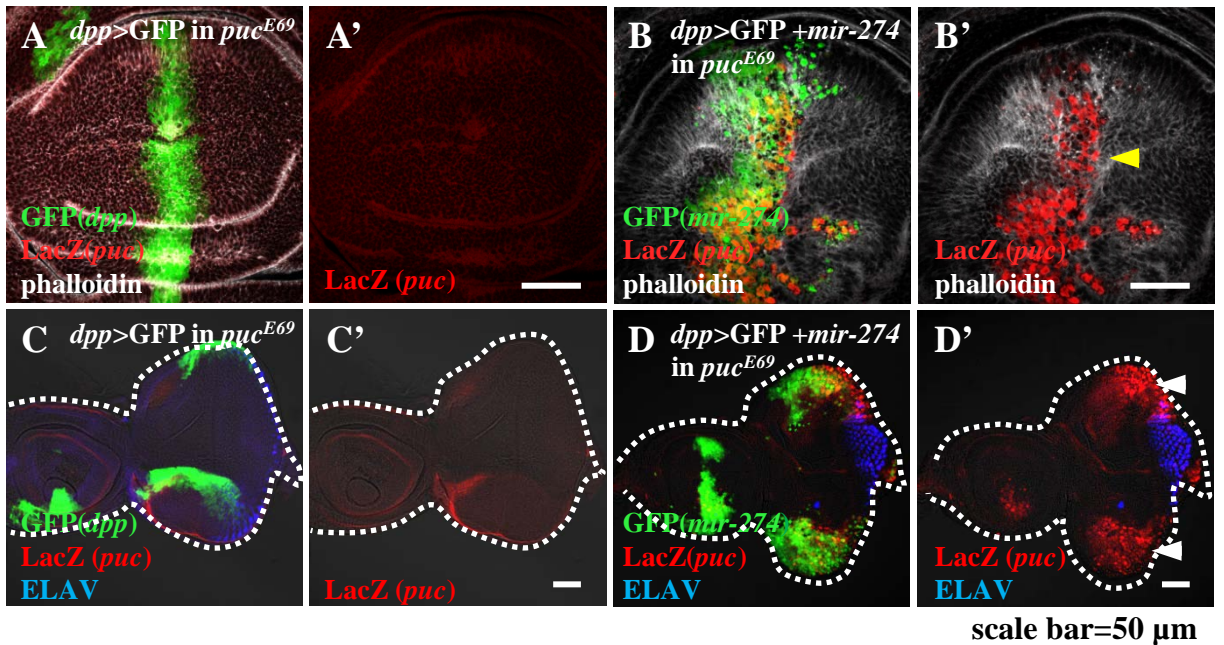
圖十二: *mir-274*表達於翅碟不同區域在三齡幼蟲翅碟皆會引起細胞移行 (A-H) 為果蠅三齡幼蟲翅碟組織免疫螢光染色結果。利用 *wg-Gal4*、*omb-Gal4* 或 *ap-Gal4*，同時表達 *mir-274* 與 GFP 於翅碟，利用 GFP 標定 *mir-274* 所表達之細胞，觀察 *mir-274* 表達於不同區域是否也會引發細胞移行。(A) 為 *wg>GFP* 三齡幼蟲翅碟，利用 GFP 標示表達細胞，顯示 *wg-Gal4* 於翅碟表現區域(綠色螢光)，Phalloidin 標示細胞骨架(F-actin, 紅色螢光)。(B) 為 *omb>GFP* 三齡幼蟲翅碟，利用 GFP 標定表達細胞，顯示 *omb-Gal4* 於翅碟表現區域(綠色螢光)，Phalloidin 標示細胞骨架(紅色螢光)。(C) *ap-Gal4* 表達於三齡幼蟲翅碟示意圖，*ap-Gal4* 只表達於腹端(dorsal)，藍色區域為表達區域(Tanimoto et al., 2000)。(D) *wg>GFP+mir-274* 三齡幼蟲翅碟，利用 GFP 標定 *mir-274* 表達細胞，觀察到標定細胞遠離原本表達區域(白色箭號)。(E-E') *omb>GFP+mir-274* 三齡幼蟲翅碟，觀察 *mir-274* 於 *omb-Gal4* 表達區域是否會產生細胞移行。(E) *omb>GFP+mir-274* 翅碟，利用 GFP 標定 *mir-274* 表達細胞，發現標定細胞離開原本表現區域(白色箭頭)。(E') 為(E)圖放大圖。(F-F'') *ap>GFP+mir-274* 果蠅三齡幼蟲翅碟不同焦平面(Focal Plane)結果。(F) *ap>GFP+mir-274* 三齡幼蟲翅碟於 peripodial membrane(PM) 結果，可觀察到 GFP 標定 *mir-274* 表達細胞出現在 PM(紅色箭號)。(F') 為 *ap>GFP+mir-274* 於三齡幼蟲翅碟 disc proper 區域結果，GFP 標定 *mir-274* 表達細胞，觀察到 *mir-274* 表達細胞出現在腹側(ventral)(黃色箭頭)。(F'') *ap>GFP+mir-274* 於三齡幼蟲翅碟基層(basal)結果，發現 GFP 標定 *mir-274* 表達細胞有侵襲(invasion)至腹側現象(綠色螢光，白色箭號)。(G) 為 *ap>GFP+mir-274* 果蠅三齡幼蟲翅碟，透過共軛焦顯微鏡掃描 Z 軸疊圖後背腹端切面圖，左側為背面(dorsal, D)，右側為腹面(ventral, V)，上方為頂端(apical)，下方為基層(basal)。可觀察到 GFP 標定 *mir-274* 表達細胞，GFP 標定細胞變圓失去柱狀結構，並遠離原本表達區域移動至腹端(ventral)(黃色箭號)，甚至移動至 peripodial membrane(PM)(綠色螢光，紅色箭頭)。



圖十三: *mir-274* 於三齡幼蟲翅碟引起細胞移行性狀會提高表皮細胞間質化標誌蛋白

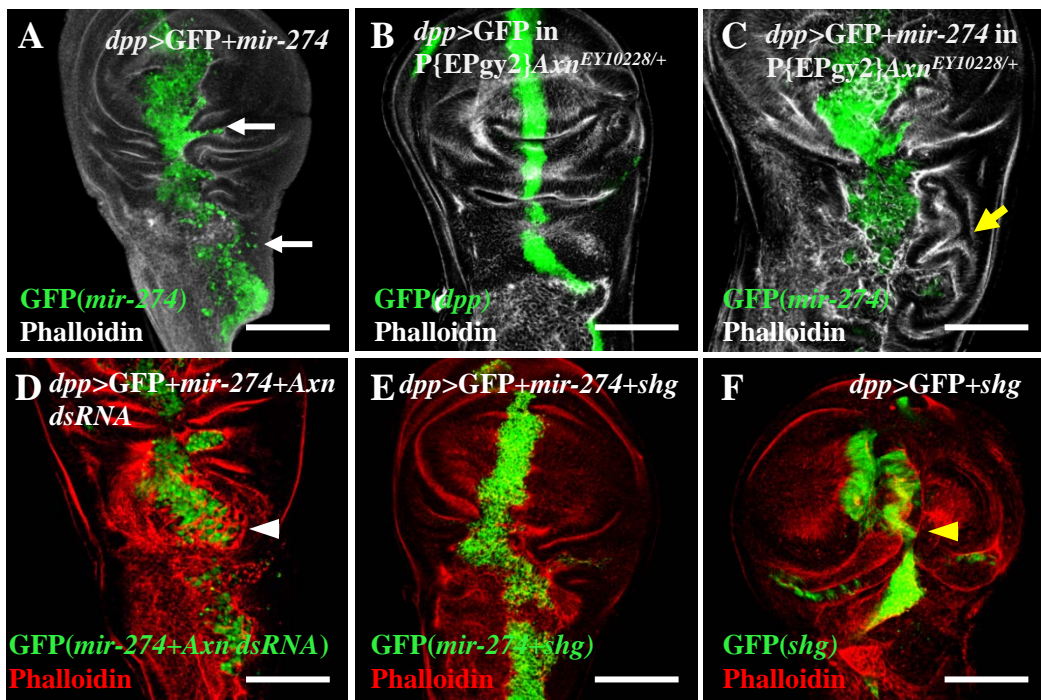
圖十三:mir-274於三齡幼蟲翅碟引起細胞移行性狀會提高表皮細胞間質化標誌蛋白

(A-H')為三齡幼蟲翅碟組織螢光免疫染色結果。利用*dpp-Gal4*同時表達*mir-274*與GFP於翅碟前後端交界處(A-P boundary)，利用GFP標定*mir-274*所表達之細胞，觀察*mir-274*表達細胞是否抑制連接蛋白或是影響細胞極性與細胞骨架構型。(A)為 w^{1118} 果蠅三齡幼蟲翅碟N-cadherin抗體染色結果，N-cadherin幾乎不表現(白色)。(B)為*dpp>GFP*果蠅三齡幼蟲翅碟Matrix metalloproteinase-1(MMP1)免疫染色結果，MMP1並不表現(白色)。(C)為 w^{1118} 果蠅三齡幼蟲翅碟Rho1抗體染色結果，可看到Rho1微弱均勻分布於翅碟中(白色)。(D)為 w^{1118} 果蠅三齡幼蟲翅碟Rab11免疫染色結果，可觀察到Rab11微弱均勻分布於翅碟中(白色)。(E-E') *dpp>GFP+mir-274*三齡幼蟲翅碟，利用GFP標定*mir-274*表達細胞，N-cadherin免疫組織染色結果。(E)*dpp>GFP+mir-274*翅碟，GFP表達細胞區域(綠色螢光)，會非自主性提高N-cadherin表現(白色，黃色箭號)。(E')為(E)圖只顯示N-cadherin抗體染色結果，表達*mir-274*會提高N-cadherin表現(白色，黃色箭號)。(F-F')*dpp>GFP+mir-274*三齡幼蟲翅碟，利用GFP標定*mir-274*表達細胞，MMP1組織免疫染色結果。(F)*dpp>GFP+mir-274*翅碟，GFP標定*mir-274*表達細胞區域(綠色螢光)，顯著提高MMP1表達(白色，黃色箭頭)。(F')為(F)單獨顯示MMP1抗體染色結果，表達*mir-274*區域顯著提高MMP1表現(白色，黃色箭頭)。(G-G')*dpp>GFP+mir-274*三齡幼蟲翅碟，利用GFP標定*mir-274*表達細胞，Rho1抗體染色結果。(G)*dpp>GFP+mir-274*翅碟，GFP標定*mir-274*表達細胞區域(綠色螢光)，顯著提高Rho1表現(白色，紅色箭號)。(G')為(G)只顯示Rho1組織免疫染色結果，可觀察到*mir-274*表達細胞非自主性提高Rho1表現(白色，白色箭號)。(H-H')*dpp>GFP+mir-274*三齡幼蟲翅碟，利用GFP標定*mir-274*表達細胞，Rab11抗體染色結果。(H)*dpp>GFP+mir-274*翅碟，GFP標定*mir-274*表達細胞區域(綠色螢光)，顯著提高Rab11表現(白色，紅色箭頭)。(H')為(H)圖只顯示Rab11組織免疫染色結果，表達*mir-274*顯著提高Rab11表現(白色，紅色箭頭)。



圖十四：表達mir-274於眼碟及翅碟會使puc-LacZ表現顯著上升

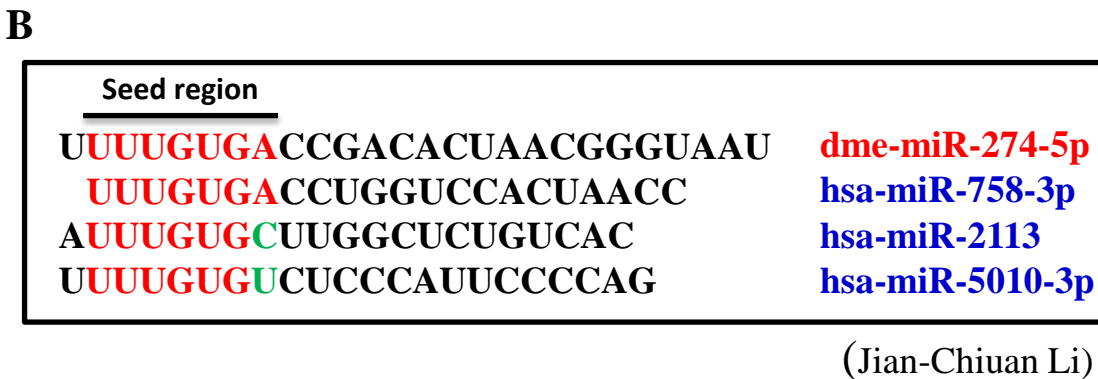
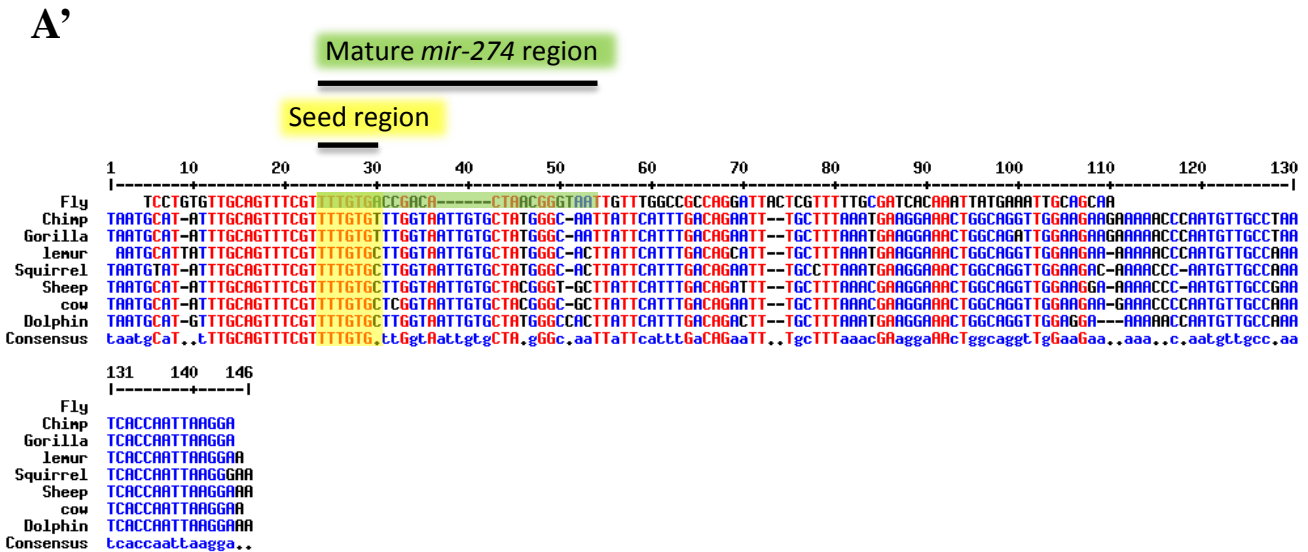
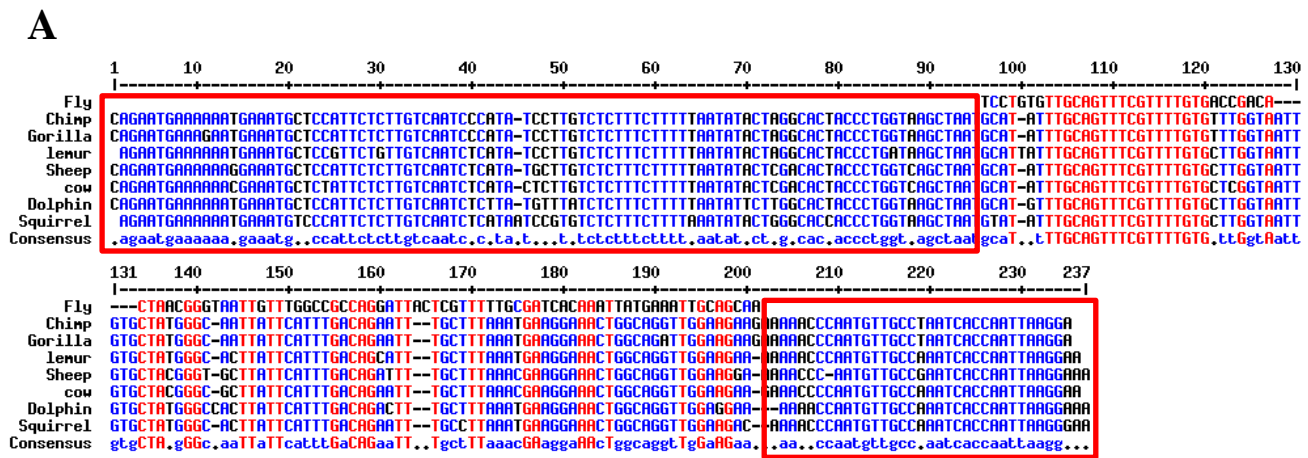
(A-D')果蠅三齡幼蟲翅碟與眼碟組織免疫染色結果。利用*dpp-Gal4*同時表達*mir-274*與GFP於翅碟前後端交界處(A-P boundary)(*dpp>GFP+mir-274*)，利用*puc^{E69}*(*puc-LacZ*)觀察*mir-274*表達細胞是否會影響JNK訊息鏈活性。(A-A')*dpp>GFP*三齡幼蟲翅碟中，利用*puc-LacZ*偵測JNK訊息鏈活性。(A)*dpp>GFP*翅碟中，GFP標示*dpp*表達細胞並無*puc-LacZ*訊號(紅色螢光)。(A')單獨呈現(A)圖*puc-LacZ*染色結果。(B-B')*dpp>GFP+mir-274*三齡幼蟲翅碟中，同時利用*puc-LacZ*偵測JNK訊息鏈活性。(B) *dpp>GFP+mir-274*翅碟中，觀察到GFP標示*mir-274*表達細胞顯著引發*puc-LacZ*訊號(紅色螢光)。(B')為只顯示(B)圖*puc-LacZ*染色結果，可觀察表達*mir-274*於翅碟，明顯提高*puc-LacZ*訊號(紅色螢光，黃色箭頭)。(C-C')*dpp>GFP*三齡幼蟲眼碟中，利用*puc-LacZ*偵測JNK訊息鏈活性。(C)*dpp>GFP*眼碟中，GFP標示*dpp*表達細胞並無*puc-LacZ*訊號(紅色螢光)。(C')單獨呈現(C)圖*puc-LacZ*染色結果。(D-D') *dpp>GFP+mir-274*眼碟中，觀察到GFP標示*mir-274*表達細胞顯著引發*puc-LacZ*訊號(紅色螢光)。(D) *dpp>GFP+mir-274*眼碟中，觀察到GFP標示*mir-274*表達細胞顯著提高*puc-LacZ*訊號(紅色螢光)。(D')單獨呈現(D)圖*puc-LacZ*染色結果，可觀察表達*mir-274*於眼碟，明顯提高*puc-LacZ*訊號(紅色螢光，白色箭頭)。(白色：Phalloidin，標示F-actin；藍色螢光：ELAV，標示視神經細胞；綠色螢光：利用GFP所標示*mir-274*表達細胞)



Scale bar=100 μm

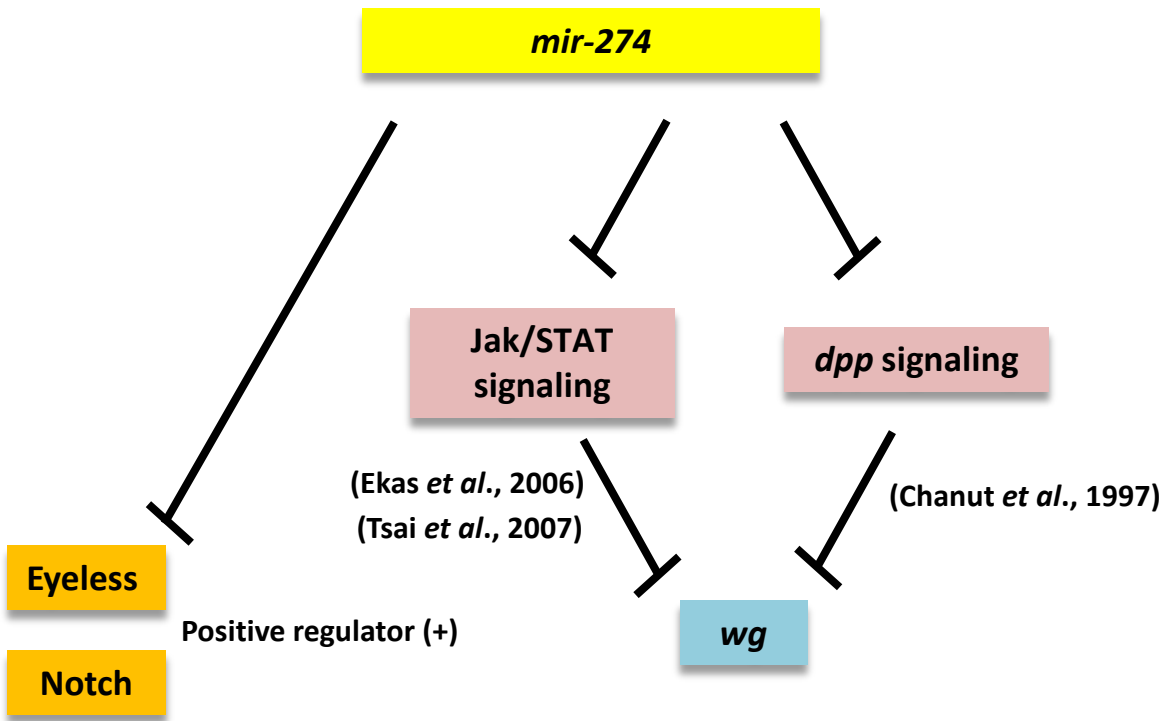
圖十五:初步測試表達*mir-274*同時降低*Axn*劑量或補回E-cadherin於三齡幼蟲翅碟，可改變*mir-274*引發細胞骨架改變性狀

(A-F)果蠅三齡幼蟲翅碟組織免疫染色結果。利用*dpp-Gal4*表達*mir-274*於翅碟前後端中線，藉由GFP標定*mir-274*表達細胞(*dpp>GFP+mir-274*)，同時透過*Axn dsRNA*與*Axn*突變株降低*Axn*劑量，或補回E-cadherin(*shotgun*, *shg*)，觀察*mir-274*引發細胞移行性狀是否有受到影響。(A)*dpp>GFP+mir-274*於三齡幼蟲翅碟，可觀察到GFP標示*mir-274*表達細胞有移行與類似侵襲(*invasion*)性狀(綠色螢光，白色箭號)。(B)*dpp>GFP*同時利用*P{EPgy2}Axn^{EY10228}*降低*Axn*劑量時，翅碟前後端交界處細胞骨架均勻分布(白色)，GFP標示細胞並沒有移行現象(綠色螢光)。(C)*dpp>GFP+mir-274*同時透過*P{EPgy2}Axn^{EY10228}*降低*Axn*劑量，於三齡幼蟲翅碟中，可觀察*mir-274*引發細胞骨架變形性狀更嚴重(白色，黃色箭號)。(D)*dpp>GFP+mir-274+Axn dsRNA*三齡幼蟲翅碟，利用*Axn dsRNA*降低*Axn*劑量會微弱增加*mir-274*所引發細胞骨架變形性狀(紅色螢光，白色箭頭)。(E) *dpp>GFP+mir-274+shg*三齡幼蟲翅碟，透過補回E-cadherin(*shg*)可抑制*mir-274*所引發細胞移行(綠色螢光)與*dpp>GFP+shg*翅碟細胞骨架變形性狀(紅色螢光)。(F)*dpp>GFP+shg*三齡幼蟲翅碟，可觀察GFP標定E-cadherin表達細胞(綠色螢光)，使翅碟細胞骨架明顯變形(紅色螢光，黃色箭頭)。(Phalloidin，標示細胞骨架：(A-C)白色、(D-F)紅色螢光)。

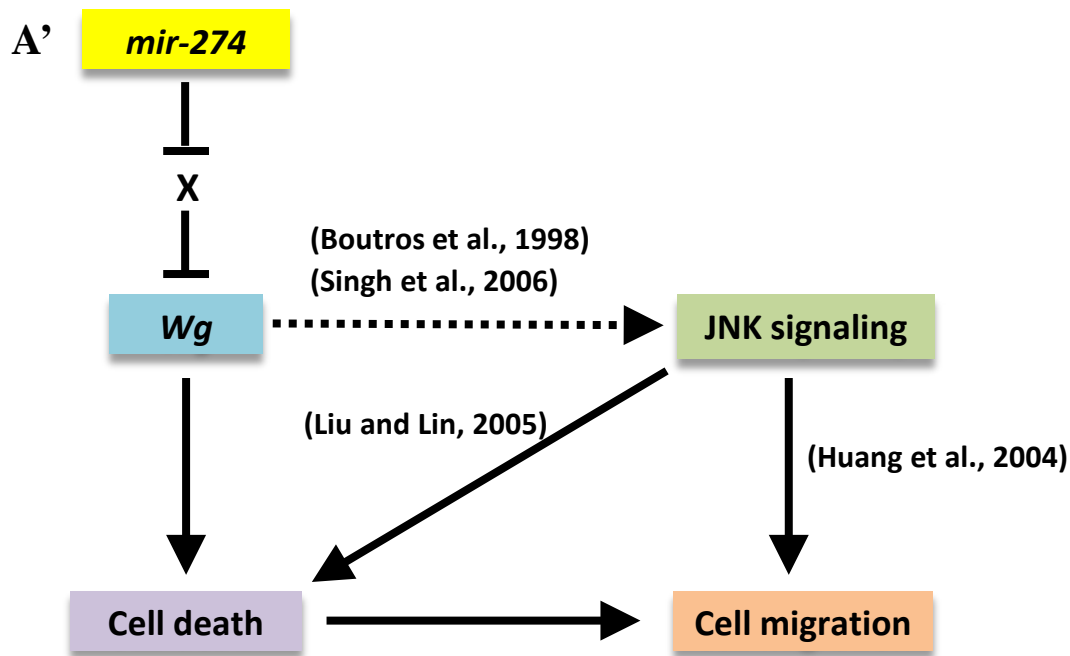
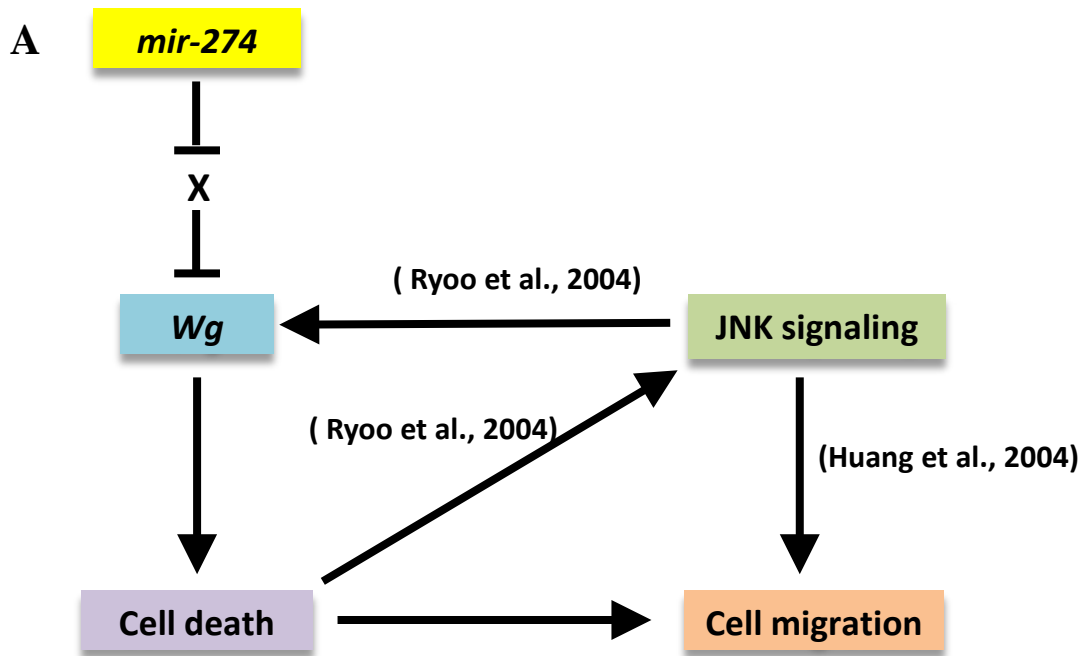


圖十六:人類*mir-758*可能為果蠅*mir-274*同源微型核糖核酸

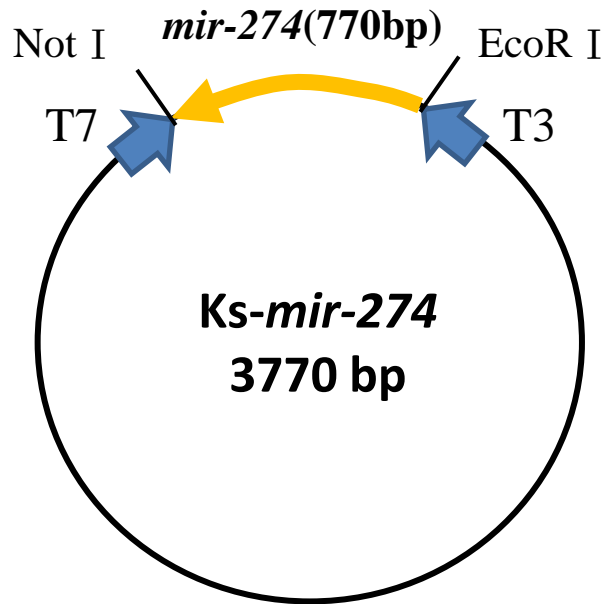
(A)將*mir-274*基因組DNA利用UCSC基因體搜尋資料庫(UCSC Genome Browser database)(<http://genome.ucsc.edu/>)與已公開基因體定序資料物種比對結果。將比對得到序列利用Multiple sequence alignment 整理結果(Corpet, 1988)。(A')為(A)*mir-274*基因組DNA序列與其他物種比對放大(黃色標示*mir-274*核心區域,綠色為*mir-274*成熟microRNA區域)。(B)*mir-274*可能人類同源microRNA序列(紅色, microRNA核心區域)。



圖十七:表達*mir-274*所導致小眼表現型可能的機制



圖十八:表達*mir-274*所導致細胞凋亡與細胞移行可能的機制



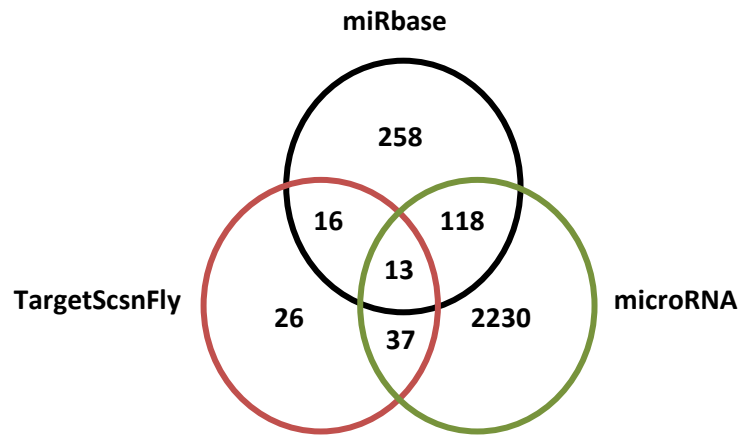
T7:anti-sense probe

T3:sense probe

附圖一:mir-274 RNA原位雜交實驗使用之質體

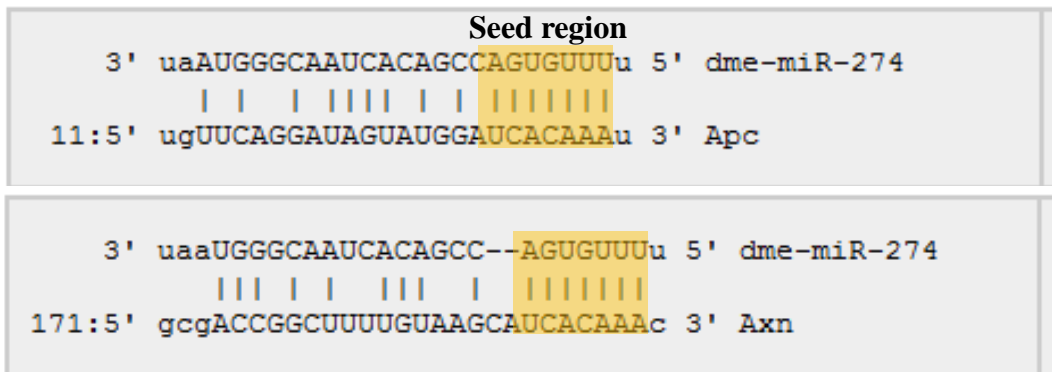
KS-mir-274質體圖譜。以KS-mir-274質體作為模板，進行體外轉錄反應 (*in vitro* transcription)，製作mir-274正向探針(sense RNA probe)與mir-274 反向探針(anti-sense RNA probe)。利用RNA原位雜交實驗(RNA *in situ* hybridization)，檢測mir-274於果蠅眼碟中表現的時間與位置。

A



	microRNA	miRBase	TargetScnFly
APC	v	v	
Axn		v	v

B



(From microRNA(<http://www.microrna.org>))

附圖二:Wingless訊息傳遞鏈的負向調控者：APC與Axn可能為mir-274目標基因

(A) 利用三 microRNA 目標基因資料庫：microRNA、miRBase 與 TargetScanFly，針對 *mir-274* 可能目標基因整理結果。發現 Wg 訊息鏈負向調控者 APC 與 Axn，共同被 miRBase 預測可能為 *mir-274* 目標基因。(B) APC 與 Axn 預測 *mir-274* 核心區域結合區域(黃色區域)，可觀察 *mir-274* 除了核心區域與 APC、Axn 結合外，其他部分也與預測目標基因有氫鍵配對。

ctcgtgattcctgatccgcacatcta atcccaatccgaaactagtttttg
 aaacacctttaagt**tgca**ttttaattttaatatggtagtttt**ggtgacga**
atcctgtgt**tgca**gtttcg**TTTTGTGA****CCGACACTAACGGGTA**ATtgttt
 ggccgccaggattactcgtttttgcgatcaciaattatgaaat**tgca**gca
 aactcaacgaaattgtggaaccagtaaaaaatagatagaaaataatatgt
 tttgtgtgcttgtgaactataagtt**tgca**ttctaa**gatgcatttatcgag**
acaagattca

mir-274 genomic DNA

mir-274 seed region

TALEN-L設計區域

TALEN-R設計區域

突變篩選primer設計區域

Enzyme cutting:

t**tgca**gtttcg**TTTTGTGA**

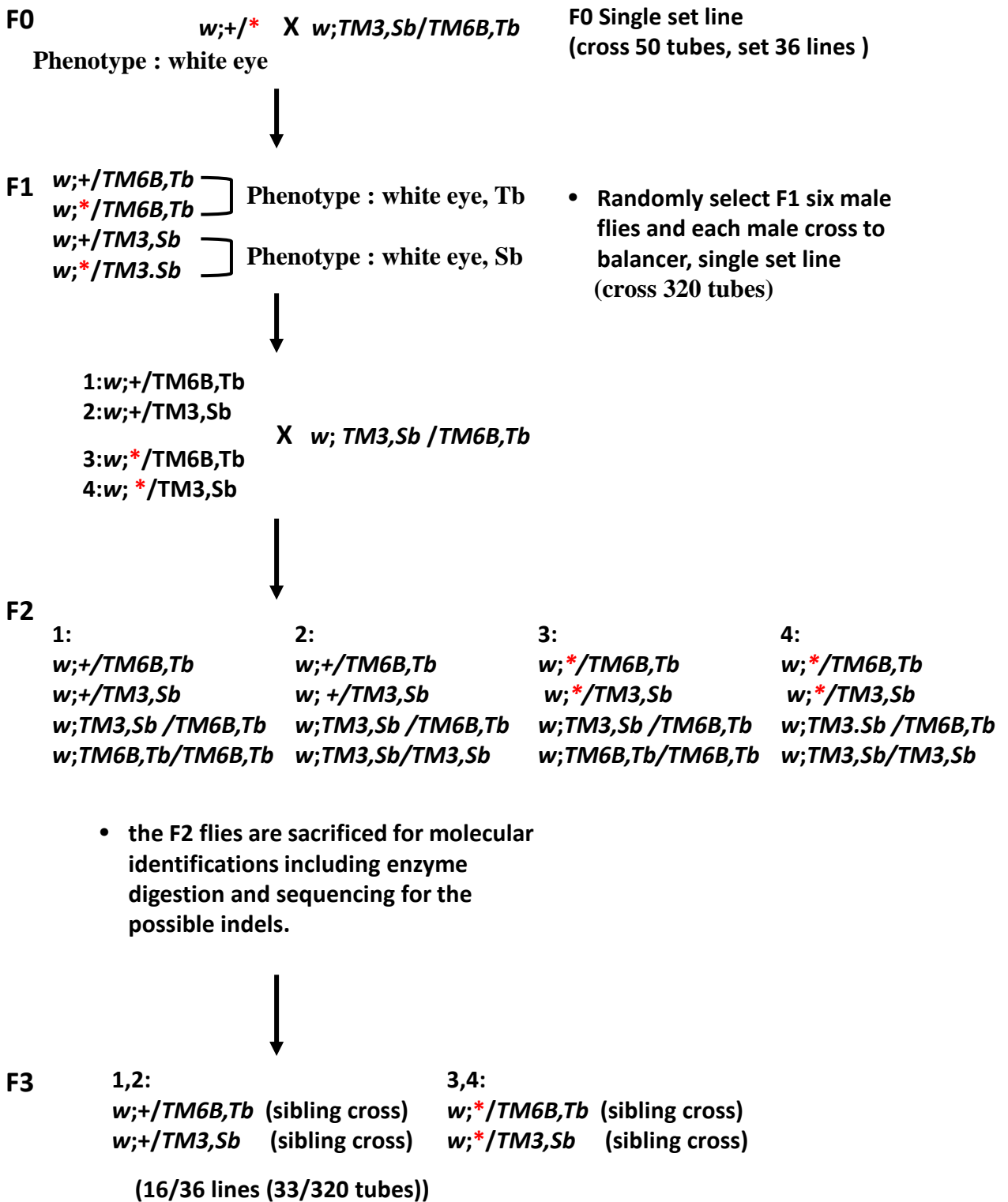
HpyCH4V

5'...TGC A... 3'

After enzyme cutting



附圖三: 以TALEN技術產生*mir-274*缺失果蠅株



附圖四：篩選 *mir-274* 缺失果蠅株