

目錄

目錄	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	4
前言.....	6
材料與方法.....	13
果蠅品系.....	13
果蠅胚胎收集.....	13
組織免疫染色.....	14
Immunoperoxidase	15
結果	16
Moesin 於果蠅中樞神經系統的腹神經索的分佈位置	16
Moesin T559 的磷酸化影響神經軸突發育.....	18
討論.....	22
胚胎神經發育與 Moesin 分布位置的探討.....	22
大量表現 Moesin 影響神經軸突發育可能的機制.....	22
參考文獻.....	26
圖表目錄.....	32
圖表說明.....	34

中文摘要

發育中神經軸突如何尋找其目標一直是神經科學基本的問題。位於軸突前端的 growth cone 接受來自外來與內在的訊號，藉由重組微絲蛋白之網狀架構來決定其路徑。微絲蛋白的重組對於神經發育中的 growth cone 是很重要的。ERM (Ezrin, Radixin, and Moesin) 蛋白家族，廣泛分部於細胞膜上且扮演連接膜蛋白與微絲蛋白間橋梁的角色。在哺乳動物研究中，已知 ERMs 參與 growth cone 的形態決定、活動力與執行功能的過程。所以在神經發育中 ERMs 是重要的。在本實驗中，我們探討果蠅中唯一的 ERMs 蛋白：Moesin，在神經發育中所扮演的角色。利用免疫組織染色法來了解 Moesin 在果蠅胚胎中樞神經細胞中的表現位置。我們發現，具有活性之 Moesin 不僅表現在神經細胞的膜上與軸突上而且在神經膠細胞膜上也有其表現。接著為了研究 Moesin 如何影響神經發育，在發育中的胚胎表現全長 Moesin、持續具有活性的 Moesin (T559D) 與持續不具有活性的 Moesin (T559A)。然後觀察在這些胚胎果蠅腹神經索中是否對於神經發育有任何影響。我們發現當利用 Tubulin-Gal4 於全身表達持續有活性的 Moesin (T559D) 時，對神經發育有嚴重的影響。顯示出持續有活性之 Moesin 會影響中樞神經的發育。從型態上之觀察，

我們推測改變 Moesin 的磷酸化對於中樞神經軸突之發育有影響。大量的磷酸化 Moesin 藉由與微絲蛋白與細胞膜上蛋白連接穩定與降低 growth cone 的活動力，抑制軸突的移動能力。推測 Moesin 可能對於軸突的 growth cone 中扮演一重要角色。

英文摘要

How axon finds its target during developing neuron is a fundamental question in neuroscience. Growth cone, the leading edge of axon, receives both external and internal cues to determine its trajectory by remodeling the filamentous actin network. The reorganization of actin filaments in growth cones is important for neural development. ERM (Ezrin, Radixin, and Moesin) protein family is widely distributed membrane protein which acts as a linkage between membrane proteins and filamentous actin. In mammals, ERMs contribute to growth cone morphology, motility, and neurites formation, suggesting the importance of ERMs in neural development. In this study, we examined the role of *Drosophila* Moesin, the sole ERMs protein found in *Drosophila*, in neuronal development. We used immunocytochemistry to determine the subcellular localization of Moesin in developing central nervous system of *Drosophila* embryo. We found that phosphorylated Moesin was not only expressed in the membrane of neurons but also in the glial cells. To study how Moesin affects neural development, we expressed full-length Moesin, constitutive-active Moesin (T559D), and constitutive-inactive Moesin (T559A) in developing embryos. We then observed whether there were any neural defects in these flies. We found that

expression of Moesin T559D through Tubulin-Gal4 gave severe neural phenotypes, suggesting that constitutive active Moesin expression interfered neural development. Based on the morphological study, we suggest that altering Moe phosphorylation may affect neural development. Lots of phosphorylated Moesin may reduce the motility of growth cone which became stabler by link actin filaments and membrane proteins, in this way inhibit the movement of axons. We suggest that Moesin might play an important role in growth cone for axon guidance.

前言

一、微絲蛋白的動態與重組調控軸突的生長

動物的神經系統為了執行其功能必須依賴發育中所建構正確神經細胞的網路連接。在胚胎發育時期，軸突必須穿越相當可觀的距離以抵達其目標。此行為稱為：axon guidance。Axon guidance 受到非常精密時間性與空間性上的調控，且這些調控已經逐漸被認為在脊椎與無脊椎動物中具有高度的保留性。Growth cone 對所經過細胞外環境線索的反應決定了軸突的生長命運。這些線索包括從周邊細胞或目標細胞分泌的配體（ligands）、或鍵結於細胞膜上的與細胞外基質上的線索。在特定的時間與特定的空間整合的資訊決定吸引或抑制軸突的生長（Tessier-Lavigne and Goodman, 1996）。線索藉由軸突上的受器（receptors）接受後活化一連串胞內訊號傳遞後，活化屬於 small GTPase Rho family 的蛋白，導致 growth cone 內的動態微絲蛋白（Actin）網路重組。且促進位於前端的 filopodia 延伸與縮回的循環（Song and Poo, 2001）。Filopodia 豐富的活動力有助於 growth cone 持續且立即地再次整合環境中的線索。在化學吸引（chemoattractants）的情況下，藉由微絲細胞骨架延長促使 filopodia 朝引導的線索前進並沿著預定的軌道移動。相反的，抑制性線索促使微絲細胞骨架去聚集化（depolymerization）與 filopodia 的縮回導致 growth cone 的崩解，最後遠離引導線索分泌的區域。因此位於 growth cone 之微絲蛋白網路架構的重組與動態對於軸突正確連接目標很重要。

二、Moesin 扮演調控微絲蛋白一重要角色

先前研究認為 Moesin 在軸突的引導上扮演著一關鍵的角色。Moesin 屬於 ERM (Ezrin, Radixin, and Moesin) 家族蛋白的其中一員。ERM 家族已知能與許多細胞膜上的蛋白如 CD44 結合並扮演連接與微絲蛋白細胞骨架間的橋梁 (Algrain *et al.*, 1993; Franck *et al.*, 1993; Tsukita *et al.*, 1994)。雖然在植物與真菌界中沒有 ERM 蛋白，但於已定序後生動物 (metazoan) 中都能發現 ERM 蛋白。此三個同源基因 (paralogs) 只存在於哺乳動物中，在其他物種中只有一 ERM 基因。哺乳動物可能藉基因複製產生三同源基因 (Bretscher *et al.*, 2002; Polesello and Payre, 2004)。果蠅 Moesin 全長與人類 moesin 和人類 ezrin 分享 58% 的相似性 (identity)，與老鼠 radixin 分享 57% 相似性。果蠅 Moesin 與哺乳動物 moesin 一樣缺少 Carboxyl 端的 polyproline 區域，此區域只存在於哺乳類的 ezrin 與 radixin 中，故名為 Moesin 或 Moesin-like (McCartney, 1996)。除此之外，果蠅 Moesin 的羧基端也分享高度的相似性，26% 與人類的 moesin、25% 與人類 ezrin、22% 與老鼠 radixin (McCartney, 1996)。

在 ERM 的氨基端上有 FERM domain (Four point one ERM domain) 與果蠅的 FERM domain 線蟲與哺乳動物的 FERM domain 有高度保留性，有 74-82% 的相似性。故 ERM 家族蛋白也隸屬於大蛋白家族 4.1 superfamily。緊接在 FERM domain 後為 α helical 然後是羧基端上的 Filamentous-actin binding site。Moesin 在未被活化前，Moesin 氨基端的 NERM associated domain (NERMAD) 與本身的羧基端上的 CERM associated

domain (CERMAD) 結合時，羧基端上的微絲蛋白結合區域遮蔽於氨基端負電荷的口袋狀構造區域，遮蔽與其他蛋白結合區域，呈現自主抑制的狀態 (Bretscher *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2000; Taukita *et al.*, 1997)。當接受訊號，如 Rho-kinase 路徑活化磷酸化位於微絲蛋白鏈結處重要且保留的 Threonine (果蠅的 T559) 後 (Nakamura *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1995)，降低兩 ERMAD 的親和力改變蛋白的構型產生具有活性開放式的 Moesin (Matsui, 1998)。活化狀態的 Moesin 已知參與在很多生物細胞的過程，如微絨毛的形成、果蠅胚胎極性的決定 (Polesello *et al.*, 2002) 與維持皮層細胞的完整 (Speck *et al.*, 2003; Hipfner *et al.*, 2004)。

ERM 蛋白被認為參與在以微絲蛋白為基礎的形態決定上。在哺乳動物細胞培養實驗中，利用 oligonucleotides 降低 ERM 蛋白表現後再利用雷射照射破壞細胞的 lamellipodia (Takeuchi *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 1997) 發現降低 ERM 蛋白後減低細胞的外觀恢復力與附着的能力。另外 ERM 蛋白對於 growth cone 的形態與活動力扮演重要的角色且參與在 growth cone 的 lamellipodia 的維持 (Paglini *et al.*, 1998、Castelo and Jay, 1999、Baumgartner *et al.*, 2006)。儘管已經有很多關於 REM 蛋白的研究，對於 Moesin 蛋白的分析卻因為其在哺乳動物中存在三個同源基因的 redundancy 所阻礙。因此我們以果蠅胚胎當作實驗模型來研究 ERM 蛋白，Moesin 在神經發育過程中對於神經連接中所扮演的角色。

在果蠅胚胎發育早期 Moesin 均勻分布於全身。胚胎生成晚期 Moesin 表現在很多組織當中，包含皮層、唾腺、前腸、中腸、後腸以及胚胎神經系統 (McCartney, 1996)。缺少 Moesin 的果蠅導致發育上的缺陷包括於卵發育過程中無法正確的分布母親的遺傳因子 (maternal determinants) (Jankovics *et al.*, 2002; Polesello *et al.*, 2002)，細胞骨架的不正常 (Polesello *et al.*, 2002) 與破壞上皮細胞完整性 (Speck *et al.*, 2003)。但對於 Moesin 於神經系統發育中扮演的角色尚未清楚。

在果蠅胚胎卵細胞的研究中顯示具有活性的 Moesin 與微絲蛋白分佈於相同位置。在 P element 的突變中 DmoeX5 germ line clones，微絲蛋白網路顯得比較鬆散且聚集於不屬於微絲蛋白聚集的細胞質內。另外在 nurse 細胞中，Moesin 突變同樣造成微絲細胞的不正常分部且細胞形狀無法維持正常的五角形。位於微絲蛋白鍵結處的 559 Threonine 的磷酸化對於 Moesin 的活性有決定性的影響。在 559 Threonine 突變成 Aspartate (Moesin-T559D) 模擬持續有活性的 Moesin，大量表現 Moesin-T559D 於 germ line 細胞中促微絲蛋白於細胞皮層的累積。559 Threonine 突變成 Alanine (Moesin-T559A) 代表無法被磷酸化的 Moesin，大量表現 Moesin-T559A 於 germ line 細胞中同 moesin 突變一樣產生不正常微絲蛋白堆積於細胞質中。顯示 MoesinThr559 的磷酸化對於卵細胞的微絲蛋白的分布扮演一重要角色 (Polesello *et al.*, 2002)。當發育中的果蠅缺少 Moesin 時，則不能成功完成決定感光細胞分化發育的上皮細胞整合 (Speck *et al.*, 2003)。在眼睛發育晚期利用 RNAi 降低 Moesin 的表現，發現缺少 Moesin 的感光細胞膜上的微絲蛋白的排列受

到擾亂，且破壞感光分子所分佈 Rhabdomeres 的微絨毛（microvillar fields）的結構與微絨毛排列有不規則的現象。利用 GMR-Gal4 降低 Moesin 在感光細胞上發育時的表現，同樣嚴重的影響微絲蛋白的網路架構與感光細胞頂端極性的分化。在果蠅眼睛研究中顯示 Moesin 藉由調控微絲蛋白網路組合來控制對於感光細胞分化的調控（Karagiosis and Ready, 2003）。

在果蠅三齡幼蟲翅盤的研究中，顯示 Moesin 對 Rho 的活性有拮抗的作用。Small GTPases 的 Rho 家族為調控微絲蛋白網路的重要調控分子。對於上皮細胞而言極性的決定是非常重要的。在野生果蠅三齡幼蟲翅盤的上皮細胞，微絲蛋白主要累積於細胞頂端且與 Moesin 分布位置一樣，另外對決定細胞頂端重要蛋白 E-Cadherin 也分布於上皮細胞頂端的位置。當利用 P element 降低 Moesin 的表現時，微絲蛋白重新分佈，分佈於不正確的位置且於細胞頂端位置的分佈量減少。同樣擾亂 E-Cadherin 的分佈，除了頂端的位置外也發現 E-Cadherin 的分佈。顯示 Moesin 對於三齡幼蟲翅盤上皮細胞極性的維持扮演一重要角色。當在三齡幼蟲翅盤的上皮細胞中大量表現 Rho 時，同樣擾亂 E-Cadherin 與微絲蛋白的分佈且細胞也無法維持正常極性。另外在果蠅三齡幼蟲翅膀盤的微絲蛋白觀察實驗中，降低 Moesin 的表現時，擾亂翅膀上皮細胞的排列。於 moeisin 突變中同時又降低 Rho 的表現則可以拯救 moeisin 突變造成的表現型。顯示出 Moesin 透過拮抗 Rho 訊息路徑的活性調控了微絲蛋白的分布與上皮細胞極性的決定（Speck *et al.*, 2003）。

綜合以上，微絲蛋白網路的重組與動態與神經軸突對線索的反應後的引導有一決定性的角色。而 Moesin 除了扮演微絲蛋白細胞骨架與細胞膜的連接者的角色外，也對微絲蛋白網路的調控有重大性的影響。因此我們推測 Moesin 可能在神經發育過程對於軸突的引導扮演一重要角色。故本實驗以果蠅胚胎的中樞神經為實驗模型，欲探討 Moesin 對果蠅胚胎中樞神經軸突引導中的功能。

三、果蠅胚胎中樞神經的發育

相對於脊椎動物的神經系統，無脊椎動物的神經系統簡單的多，但兩者在軸突引導的很多基本模型與原理是相似的。又遺傳上的分析容易，有很多的方法已臻至成熟，如可以在特定時間與空間大量表現或降低有興趣蛋白的表現、可以允許突變細胞以鑲嵌的方式呈現的複製的標記 (Newsome *et al.*, 2000; Lee and Luo, 1999)。最後還具有很多的針對特定神經細胞的抗體可以偵測各式表現型 (Fujita *et al.*, 1982; Zipursky *et al.*, 1984)。有以上的優點，因此我們利用果蠅胚胎的腹神經索 (ventral nerve cord) 來研究 Moesin 於神經發育中軸突引導所扮演的角色。

果蠅胚胎發育可以分為 17 個階段 (Hartenstein and Campos-Ortega, 1984)。在第 5 階段腹神經索中樞神經母細胞 (neuroblasts) 起源自外胚層特化的神經原區域 (neurogenic region) 此時的中樞神經屬於胚帶 (germ band) 的組織。中外胚層 (mesectoderm) 將神經原區域從中胚層分開來。The procephalic neurogenic region 發育成頭部，緊接著的 the anlage of

the optic lobe 發育剩下的頭部區域。第 8 階段腔腸化後，神經原區域的細胞開始膨脹。第 9 至 11 階段，神經母細胞開始從外胚層分層。總共有三次分層，使胚胎中線兩側各有三排的神經母細胞。胚胎開始分層後在 9 至 13 階段，神經母細胞進行 8 次的有絲分裂 (Hartenstein *et al.*, 1987)。此時產生膠原母細胞，座落於神經母細胞與中胚層中。每個膠原母細胞再分裂一次產生一個膠原母細胞與一個神經，在神經母細胞上形成一排不規則逐漸增厚的細胞層。在第 11 階段中外胚層與胚胎表層開始分離，在第 12 階段隨著胚胎分層化，可以從側面觀察到鋸齒化的中樞神經索。

在第 11 階段，未來會形成視神經葉 (optic lobe) 的細胞還位於頭部的外胚層中。細胞於第 12 階段時移動至大腦各半葉的底端，且繼續維持著上皮細胞的特性。神經分化開始於第 13 階段，一群神經細胞於中樞神經的背側向下延伸出纖維骨架。接著神經束 (fascicles) 沿著之前的神經前驅細胞形成。縱向的纖維形成 connectives；每個節的橫向纖維跨越中線且與中線的膠原細胞接觸形成兩 commissures，分作前後兩個。離開中樞神經的 Motor neuronal 軸突向外延伸成周邊神經系統，分成 intersegmental 與 segmental 神經纖維。從第 14 階段開始，腹神經索開始向頭部緊縮，在第 17 階段鋸齒狀消失，最終發育為完整胚胎中樞神經。

材料與方法：

一、果蠅品系

本實驗以黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 作為實驗材料。GFP 為控制組果蠅。UAS-Dmoesin-Myc 是帶有 Myc tag 的全長果蠅 Moesin 之基因轉殖果蠅。UAS-DmoesinT559D-GFP 是帶有 GFP tag 的第 559 Threonine 突變為 Aspartate 的 Moesin，模擬持續具有活性的 Moesin。UAS-DmoesinT559A-GFP 是帶有 GFP tag 的第 559 Threonine 突變為 Alanine 的 Moesin，代表持續不具有活性的 Moesin。Elav-Gal4 與 UAS-GFP; Tublin-Gal4/S-T 分別大量表現有興趣蛋白於神經細胞與全身細胞中。另外利用 w^+ ; Gcm-Gal4, mCD8GFP 大量表現蛋白於發育中神經膠細胞。所有果蠅均以標準果蠅培養基飼養，並飼養於室溫或 25°C 培養箱中。Moesin 突變轉殖基因果蠅來自 Ready 實驗室。其他果蠅來自於孫以瀚老師實驗室。

二、果蠅胚胎收集

將果蠅存放於 100 mL 空氣流通的容器中，與灑上酵母粉的葡萄汁培養基密合。倒轉整個裝置，培養於 25°C 培養箱中。以欲收集的胚胎階段分別在不同時間於 25°C 下培養；階段第 12-13 (7-10 小時)、階段第 14-15 (10-13 小時) 與階段第 16-17 (13-16 小時)。培養時間過後再以水彩筆藉自來水輕輕劃過葡萄汁培養基，利用胚胎濾網過濾收集。於玻璃培替氏培養皿 (petri dish) 浸泡於 50% 漂白水 (界面必須剛好滿於過濾網輪緣) 三分鐘以除去胚胎最外層的絨毛膜 (chorion)，在三分鐘內重複利用漂白水浸溼胚胎。接著以自來水沖洗至漂白水味完全消

格式化: 字型: Times New Roman

失。再利用 dd H₂O 沖洗至 1.5 mL microtube 中，並從管中除去所有的水。利用 0.5 mL 庚烷與 0.5 mL 固定液（0.1M Hepes, pH6.9, 2mM MgSO₄, 3.7% formaldehyde）培養 30 分鐘並劇烈震盪。固定後盡可能吸取並丟棄下層水層界面的甲醛溶液。加入 0.5 mL 甲醇，再次劇烈震盪至所有胚胎於下層界面，在此除去第二層 viteline membrane。吸取並除去庚烷與甲醇。以甲醇潤洗三至四次以除去多餘的庚烷。在 4°C 下將胚胎儲存於甲醇。

三、組織免疫染色

將上述方法所收集的果蠅胚胎於 1 mL PBST（10mM NA₂HPO₄, 20mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, and 0.1% Triton X-100）潤洗三次每次十分鐘。培養於含有 0.5% BSA 的 PBS-BT（1X PBST and 0.5% BSA）中搖晃 30 分鐘。在解剖顯微鏡下解剖果蠅胚胎的中樞神經。接著進行一級抗體作用，置於 4°C 進行隔夜作用。在本實驗用到的一級抗體包括 rabbit anti-Moesin（1:1000），rabbit anti-phosphorylated mammalian Ezrin/Radixin/Moesin（1:200; Cell signaling），mouse anti-BP102（1:50; DSHB），mouse anti-1D4（1:50; DSHB），mouse anti-8D12（1:50; DSHB），分別以不同稀釋比例稀釋於含有 0.5% BSA 的 PBS-BT 中。隔天以 PBST 清洗三次，每次十分鐘。二極抗體以 PBS-BT 溶液稀釋，稀釋倍數為 1：200，室溫下作用兩小時。本實驗所用到二極抗體包括 FITC 或 HRP 鍵結的 anti-rabbit 或 anti-mouse IgG（Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA., USA）。經過 PBST 清洗三次，每次十分鐘後，以 mounting medium 封片（20 mL 10X PBS, 100 mL glycerol, 4g N-

propyl gallate and 80 mL dd H₂O, pH8.5) 。封片後於共軛焦顯微鏡下觀察 LSM510 (ZEISS, Germany) 。

四、Immunoperoxidase

將上述方法所收集的果蠅胚胎於 1 mL PBST 潤洗三次每次十分鐘。培養於含有 0.5% BSA 的 PBS-BT 中 30 分鐘並搖晃。在解剖顯微鏡下解剖獲得果蠅胚胎的中樞神經。接著進行一級抗體作用，隔夜置於 4°C。在此實驗用到的一級抗體包括 mouse anti-BP102 (1:50; DSHB)，mouse anti-1D4 (1:50; DSHB)，mouse anti-8D12 (1:50; DSHB)。以 1:50 稀釋比例稀釋於含有 0.5% BSA 的 PBS-BT 中。隔天以 PBST 清洗三次，每次十分鐘。二級抗體以 PBS-BT 溶液稀釋，稀釋倍數為 1:200，室溫下作用兩小時。此實驗所用到二級抗體為 HRP (Horseradish Peroxidase) 鍵結的 anti-mouse IgG (Molecular probe)。經過 PBST 清洗三次，TBS 清洗一次，每次十分鐘後，置換於含有 AEC (aminoethylcarbazole) kit chromogen (Zemed Laboratories Inc.) 溶液中。溶液中含有雙氧水提供氧化劑，AEC 經過氧化後，呈現紅色或棕紅色可見光。為時五分鐘後，於顯微鏡下觀察是否呈色成功。成功後再置換於 TBS 五分鐘後，以 50% glycerol 封片。封片完後以倒立式顯微鏡以 DIC 視野下觀察 Axio Vision Rel. 4.7 (ZEISS, Germany) 。

結果

一、Moesin 於果蠅中樞神經系統的腹神經索的分佈位置。

為了探討 Moesin 在神經系統發育過程中可能扮演的角色，我們利用免疫組織染色來觀察 Moesin 在果蠅中樞神經系統的腹神經索的分佈位置。首先利用 anti-Moesin 的抗體偵測 Moesin 於胚胎第 17 階段腹神經索的分佈位置，結果顯示 Moesin 均勻分布於所有腹神經索細胞的細胞質與細胞膜上（圖一 A）。接著利用 anti-phosphorated mammalian ERM 的抗體偵測磷酸化 Moesin，代表具有活性的 Moesin 於胚胎第 17 階段腹神經索的分佈位置。結果顯示具有活性的 Moesin 主要集中於細胞膜上與軸突的骨架上（axon scaffold）（圖一 B）。

已知 Moesin 與具有活性的 Moesin 分佈於胚胎腹神經索上，下一步我們同樣利用免疫組織染色來觀察具有活性的 Moesin 在果蠅發育過程中樞神經系統的腹神經索細胞分佈位置。由於神經分化開始於第 13 階段，神經纖維發育也始於第 13 階段，所以我們分別觀察胚胎第 13 階段（圖二 A）、第 15 階段（圖二 B）與胚胎神經系統發育完全的第 17 階段（圖二 C）腹神經索中具有活性的 Moesin 分佈位置。我們發現，隨著不同發育的階段具有活性的 Moesin 主要集中於細胞膜上與軸突的骨架上。在胚胎第 15 階段每節間軸突的縱向連接還未連接時候，具有活性的 Moesin 已分佈於縱向連接的軸突上。在第 17 階段看到於軸突上具有活性的 Moesin 與腹神經索的軸突骨架分布位置一樣。藉由觀察 Moesin 在果蠅中樞神經系統的腹神經索

的分佈位置，我們推測 Moesin 與神經軸突的發育與引導有密切的關係。

果蠅胚胎的中樞神經系統神經細胞佔大多數，（每半節的腹神經索中有 350 個細胞 290 interneurons、30 motoneurons 與 30 glial cells. Landgraf *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1995）除了神經細胞還有小部份的神經膠細胞。我們也利用免疫組織染色來觀察具有活性的 Moesin 在果蠅腹神經索的神經膠細胞上分佈位置。利用共軛焦顯微鏡 Z 軸堆疊掃描 10 μ m 厚度，每 2 μ m 一張堆疊而成。我們發現具有活性的 Moesin 分佈在某些神經膠細胞的膜上，但只有在特定區域的神經膠細胞的膜上，不完全分佈於所有神經膠細胞膜上（圖三）。Moesin 分佈於果蠅胚胎發育中的腹神經索的神經細胞與神經膠細胞上。但對於其於發育神經系統中扮演的角色還不清楚，因此我們利用 *Elav-Gal4* (embryonic lethal, abnormal vision) 與 *Tublin-Gal4* 分別大量表現不同構型的 Moesin 於發育中的神經細胞與胚胎發育早期的所有細胞中，來探討 Moesin 對於神經發育軸突的引導是否有任何影響。利用免疫組織染色來觀察 Moesin、MoesinT559D 與 MoesinT559A 大量表現的效率（圖四）。發現大量表現 Moesin、MoesinT559D 時，磷酸化的 Moesin 也增加。大量表現 MoesinT559A 時則不會增加磷酸化的 Moesin 的表現。因此我們利用此 UAS-Gal4 系統觀察不同構型的 Moesin 對發育中樞神經系統軸突引導的影響。

二、Moesin T559D 的磷酸化影響神經軸突發育

首先利用 *Elav-Gal4* 大量表現 Moesin、MoesinT559D 與 MoesinT559A 於第 12 階段發育中的神經細胞中。並利用 anti-BP102 抗體，anti-BP102 可以偵測與微管交互作用蛋白 (microtubule associated protein)，藉此觀察神經骨架的表現型。第 17 階段的果蠅胚胎腹神經索軸突骨架發育成如鐵軌的模式，縱向軌道為 longitudinal tracts 左右各一、每節中各有兩軌道連接左右兩縱向軌道分別為 anterior commissures 與 posterior commissures。這些軌道於胚胎神經發育完全後以鐵軌樣式連接起每節的神經細胞以利傳遞訊息，如同脊椎動物中的脊索。利用 *Elav-Gal4* 大量表現 Moesin 與 MoesinT559A 於發育中神經細胞時，發現胚胎腹神經索軸突骨架依舊可以正常發育成鐵軌樣式 (圖五 A, B, C)。但當大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞時，發現胚胎腹神經索軸突骨架節與節之間的縱向連接軸突受到輕微抑制，縱向連接的軸突有減少的現象 (圖五 D)。統計結果顯示以 *Elav-Gal4* 大量表現 Moesin 與 GFP 完全沒有觀察此現象 (Elav>GFP, 179 segments; Elav>Moe, 121 segments)。以 *Elav-Gal4* 大量表現 MoesinT559A 時，1.12 % 的節數中有此現象 (Elav>MoeT559A, 188 segments)。Elav-Gal4 大量表現 MoesinT559D 時，11.91% 的節數中有降低縱向神經軸連接的現象 (Elav>MoeT559D, 207 segments)。且 Elav>MoeT559D 組與對照組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例有顯著差異 (p value=0.01869) (圖六)。

另外利用 *Tubulin-Gal4* 於胚胎發育早期全身細胞大量表現 *Moesin*、*MoesinT559D* 與 *MoesinT559A*。同樣利用 *anti-BP102* 抗體觀察第 17 階段的果蠅胚胎腹神經索軸突骨架表現型。利用 *Tubulin-Gal4* 大量表現 *Moesin* 與 *MoesinT559A* 於發育中全身細胞時，發現胚胎腹神經索軸突骨架依舊可以正常發育成鐵軌樣式（圖七 A, B, C）。但當大量表現 *MoesinT559D* 於發育全身細胞時，發現胚胎腹神經索軸突骨架節與節之間的縱向連接軸突受到抑制，縱向連接的軸突有明顯減少的現象。且為隨機出現於任一神經節中，並不是每一神經節均有此現象（圖七 D）。統計結果顯示以 *Tub-Gal4* 大量表現 *Moesin*、*MoesinT559A* 與 GFP 中縱向神經軸連接減少的現象出現機率非常低（*Tub>GFP*, 162 segments; *Tub>Moe*, 100 segments; *Tub>MoeT559A*, 130 segments,）。以 *Tub-Gal4* 大量表現 *MoesinT559D* 時，半數的節數中有減少縱向連接現象，46.67%的節數中有降低縱向神經軸連接的現象（*Tub>MoeT559D*, 148 segments）。且 *Tub>MoeT559D* 組與對照組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例有顯著差異（ $p\text{ value}=0.006321$ ）（圖八）。

接著藉偵測 *Fasciclin II* 的 *anti-1D4* 抗體來觀察位於中線兩邊各三條的主要縱向神經束。此三條神經束從中線往外分別為 *medial*, *intermediate* 與 *lateral FasII fascicles*，從中線附近神經細胞發展出來的軸突分別於不同神經束經過僅有一次轉彎後再平行於體軸。神經細胞藉由細胞膜上不同 *Robo* 受體的組合與從中線分泌出的配體產生的濃度梯度來決定該在哪一條神經束上往縱向發展。第 17 階段最終發育成中線兩側主要各三條縱向的神經束。利用 *Elav-Gal4* 大量表現 *Moesin* 與 *MoesinT559A* 於發育

中神經細胞時，發現胚胎腹神經索的縱向神經束如同控制組 *Elav>GFP* 的神經束可以正常發育成中線兩側主要各三條縱向的神經束（圖九 A, B, C）。但當大量表現 *MoesinT559D* 於發育中神經細胞時，發現最外側的 *lateral FasII fascicles* 的連結有缺陷，此神經束連接的軸突有減少的現象（圖九 D）。另外利用 *Tublin-Gal4* 於胚胎發育早期全身細胞大量表現 *UAS Moesin*、*MoesinT559D* 與 *MoesinT559A*。同樣利用 *anti-1D4* 抗體觀察第 17 階段的果蠅胚胎腹神經索縱向神經束的表現型。利用 *Tubulin-Gal4* 大量表現 *Moesin* 與 *MoesinT559A* 於發育中全身細胞時，發現胚胎腹神經索的縱向神經束如同控制組 *Tubulin>GFP* 的神經束可以正常發育成中線兩側主要各三條縱向的神經束（圖十 A, B, C）。但當大量表現 *MoesinT559D* 於發育全身細胞時，發現具有活性的 *Moesin* 影響胚胎腹神經索三條縱向的神經束之間的縱向連接軸突的發育，有些缺少最外側的神經束、有些區域三條神經束都不見、有些通過中線抵達另一邊的神經束。且缺陷為隨機出現於任一神經節中，並不是每一神經節均有此現象（圖十 D）。

最後利用 *anti-8D12* 抗體偵測神經膠細胞核內的 transcription factor: *Repo*，來代表神經膠細胞本體的分布位置。在第 11 階段野生型的果蠅，從側外胚層來的神經膠母細胞（*glioblast*）進行第一次的分裂。神經膠母細胞遷移至中線後再行一次分裂，於第 12 階段末抵達他們於 *neuropile* 的位置。後來加入兩個來自不同來源的細胞，增加為六個 *interface glia*。第 14 階段這些 *interface glia* 隨著 *neuropile* 移動，且覆蓋於縱向軸突之上。細胞繼續分裂並於第 16 階段排列成明顯的兩列細

胞，每半節神經索上有 9-10 個神經膠細胞 (Hidalgo *et al.*, 1995)。

利用 Tubulin-Gal4 大量表現 Moesin 與 MoesinT559A 於發育中全身細胞時，發現胚胎腹神經索的神經膠細胞如同控制組 Tubulin>GFP 的神經束可以正常發育成兩列的神經膠細胞排列 (圖 十一 A, B, C)。但當大量表現 MoesinT559D 於發育全身細胞時，發現具有活性的 Moesin 影響胚胎腹神經索神經膠細胞的分佈，有些神經節的神經膠細胞完全缺失或部份缺失。與縱向神經束連接同樣為隨機出現於任一神經節中，並不是每一神經節均有此現象 (圖 十一 D)。綜合以上結果，無論在神經細胞或胚胎發育中全身細胞大量表現 Moesin 與 MoesinT559A 對於神經細胞的軸突發育沒有發現任何缺陷。在神經細胞大量表現 MoesinT559D 時，對於縱向的神經軸突連接有輕微的抑制現象，且 lateral FasII fascicles 連結也受到抑制。於胚胎發育中全身細胞大量表現持續具有活性 MoesinT559D 時對軸突骨架的縱向的連接有的抑制現象、FasII fascicles 連結減少與錯誤的分佈且同時擾亂神經膠細胞分佈。

討論

一、胚胎神經發育與 Moesin 分布位置的探討

引導軸突建立正確連接對於神經系統的發育扮演一舉足輕重的角色。本研究中顯示 Moesin 可能參與在引導軸突建立正確連接裡。在前人利用 hsp70 promoter 表現 GFP 連接 Moesin 的蛋白顯示 Moesin 分佈於胚胎晚期的中樞神經中 (Edwards *et al.*, 1997)。在本實驗中利用 Moesin 與 phosphorylated ERM 的抗體偵測 Moesin 均勻分佈於胚胎腹神經索所有細胞而具活性 Moesin 主要分布於神經細胞膜上與軸突纖維上。顯示磷酸化的 Moesin 才具有能力鍵結於膜上。且隨著神經發育具活性 Moesin 分佈與胚胎腹神經索的軸突骨架發育有關連。在第 15 階段的胚胎中，我們發現神經軸突骨架還未發育的地方、具有活性的 Moesin 已經分佈於軸突骨架節與節間的連結。猜測具有活性 Moesin 參與於神經軸突的引導，且其磷酸化對執行功能是重要的。除此我們也發現具有活性的 Moesin 分佈於神經膠細胞中，Moesin 可能也參與神經膠細胞的發育過程中。

二、大量表現 Moesin 影響神經軸突發育可能的機制

為了探討 Moesin 在神經系統發育過程中可能扮演的角色，本實驗利用 Elav-Gal4 表現不同構型的 Moesin 於發育中胚胎神經細胞與 Tubulin-Gal4 表現不同構型的 Moesin 於發育中胚胎所有細胞。無論於全身細胞或發育中神經細胞表現 Moesin 全長與持續不具有活性 MoesinT559A 對於神經軸突連接不具任何明顯影響力。表現持續具有活性 MoesinT559D 於發育中神經細胞對於神經縱向軸突連接有輕微抑制效果。表現持續具有活性

MoesinT559D 於全身胚胎細胞導致嚴重且抑制神經縱向軸突連接，且擾亂神經膠細胞的正常分佈。推測磷酸化後的活性 Moesin 可能對於神經軸突的引導扮演一重要的角色。

本實驗中結果顯示表現持續具有活性 MoesinT559D 於全身胚胎細胞嚴重影響神經軸突發育與嚴重擾亂神經膠細胞分佈位置。從免疫組織染色結果發現，利用 Tublin-Gal4 大量表現 MoeseinT559D 於早期胚胎全身細胞後，觀察第 17 階段胚胎腹神經索中具有活性的磷酸化 Moesin 大量累積於神經軸突骨架的纖維上。且利用 Elav-Gal4 大量表現 MoeseinT559D 於胚胎中發育神經細胞時，發現具有活性的磷酸化 Moesin 於腹神經索表現量也有增加現象。但是擾亂神經發育的現象卻只發生在大量表現持續具有活性 MoesinT559D 於全身胚胎細胞時。我們推測可能原因如下，首先，利用 Tublin-Gal4 於胚胎發育早期即產生作用，持續具有活性 MoesinT559D 表現早，作用時間長。其二，利用 Tublin-Gal4 表現位置遍佈全身，因此其作用位置較 Elav-Gal4 作用只在發育中神經細胞廣。因此當利用 Tublin-Gal4 大量表現 MoesinT559D 時，可能主要作用於神膠細胞或同時於神經細胞與神經膠細胞作用影響神經軸突引導的發育。另外當利用 Tublin-Gal4 表現全長 Moesin 與持續不具有活性 MoesinT559A 時，對於神經發育沒有明顯影響。從免疫組織染色結果觀察具有活性的磷酸化 Moesin 表現量，發現無論是 Tublin-Gal4 表現全長 Moesin 時，具有活性的磷酸化 Moesin 表現量有些微上升且主要累積於軸突骨架與神經細胞邊界上。但是 Tublin-Gal4 表現全長 Moesin 時，具有活性的磷酸化 Moesin 表現量沒有利用 Tublin-Gal4 表現 MoesinT559D 時多。Tublin-Gal4 表現持續不具有活性

MoesinT559A 時，沒有增加具有活性的磷酸化 Moesin 表現量。綜合以上，Moesin 必需經由磷酸化其具有高度保留的 559 Threonine，使其具有活性後。且作於早期神經膠細胞或發與發育中神經細胞影響神經軸突的引導。

前人於果蠅三齡幼蟲翅原盤的研究，顯示 Moesin 藉由調整微絲蛋白架構去調控上皮細胞極性的完整。他們發現 Moesin 突變後抑制微絲蛋白累積。於三齡幼蟲的眼盤上表現持續具有活性 MoesinT559D 可回復 Moesin 突變造成翅膀細胞不正常排列與微絲蛋白無法分佈於膜上的外表型。但當表現全長 Moesin 或持續不具有活性 MoesinT559A 則無法拯救 Moesin 突變造成的外表型。且大量表現 MoesinT559D 促使微絲蛋白累積於翅膀的上皮細胞中。但當表現全長 Moesin 或持續不具有活性 MoesinT559A 則無法促使微絲蛋白累積於翅膀的上皮細胞中。在其實驗中顯示出 Moesin 的磷酸化對於 Moesin 的活性扮演著舉足輕重的角色，Moesin 必須受到適當蛋白磷酸化其 559Threonine 後，才具有執行 Moesin 功能的能力 (Speck *et al.*, 2003)。因此我們推測在本實驗中，果蠅胚胎腹神經索上表現持續具有活性狀態的 Moesin 時，由於其扮演微絲蛋白網路與膜蛋白間橋梁角色。可能促使微絲蛋白累積並穩固於神經細胞膜上，因此降低 growth cone 的動態活動力進而抑制軸突生長。且其位於微絲蛋白鍵結處的 559 Threonine 磷酸化可能必需受到某些蛋白調控才使 Moesin 具有活性，故大量表現全長 Moesin 對於軸突發育不具影響。或表現無法被活化 MoesinT559A 也對於軸突發育不具影響，顯示 Moesin 可能須被磷酸化後才能執行其功能。

在本實驗中還不清楚 Moesin 對於軸突的引導中參與於什麼機制中。如欲了解 Moesin 對於神經發育軸突引導中扮演的角色，應有 Moesin 缺失的果蠅胚胎。但當我們利用 Elav-Gal4 表現 Moesin RNAi 於發育中胚胎神經細胞與 Tubulin-Gal4 表現 Moesin RNAi 於發育中胚胎所有細胞時，都無法有效降低其表現。可能因為 Elav 平均第 12 階段開始表現，我們觀察第 17 階段發現效果不佳，可能第 12 階段時開始表現已太晚。而 Tubulin-Gal4 從胚胎第一階段開始表現於全身結果可能使胚胎無法擁有正常極性導致無法正常發育 (Polesello *et al.*, 2002) 無法觀察胚胎晚期中樞神經的發育。故想要觀察 Moesin 對於神經發育軸突引導中扮演的角色需要應用其它方法如利用 heat shock promoter 於適當時間下降低 Moesin 表達或於製作小區域的細胞中的 Moesin mutant clone。藉此觀察 Moesin 對於神經發育軸突引導中扮演正常的角色。

References

Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D. and Arpin, M. (1993). Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J. Cell Biol.* 120, 129-139.

Araújo, S. J. and Tear, G. (2003). Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates. *Nat Rev Neurosci* 4, 910-22.

Baumgartner, M., Sillman, A. L., Blackwood, E. M., Srivastava, J., Madson, N., Schilling, J. W., Wright, J. H. and Barber, D. L. (2006). The Nck-interacting kinase phosphorylates ERM proteins for formation of lamellipodium by growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 13391-6.

Bretscher, A., Edwards, K. and Fehon, R. G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 586-99.

Castelo, L. and Jay, D. G. (1999). Radixin is involved in lamellipodial stability during nerve growth cone motility. *Mol Biol Cell* 10, 1511-20.

Franck, Z., Gary, R. and Bretscher, A. (1993). Moesin, like ezrin, colocalizes with actin in the cortical cytoskeleton in cultured cells, but its expression is more variable. *J. Cell Sci.* 105, 219-231.

Fujita, S. C., Zipursky, S. L., Benzer, S., Ferrus, A. and Shotwell, S. L. (1982). Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. Proc. Natl Acad. Sci. USA 79, 7929-7933

Guan, K. L. and Rao, Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. Nat Rev Neurosci 4, 941-56.

Hartenstein, V. and Campos-Ortega, J. A. (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. Roux Arch. dev. Biol. 193(5): 308-325

Hartenstein, V., Rudloff, E. and Campos-Ortega, J. A. (1987). The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. Roux Arch. dev. Biol. 196(8): 473-485.

Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. and Technau, G.M. (1995). The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. Development 121, 317-32.

Hidalgo, A., Urban, J. and Brand, H. A. (1995). Targeted ablation of glia disrupts axon tract formation in the *Drosophila* CNS. Development 121, 3703-3712.

Hipfner, D.R., Keller, N., and Cohen, S.M. (2004). Slik Sterile-20 kinase

regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth. *Genes Dev.* 18, 2243-2248.

Ito, K., Urban, J., and Technau, G.M. (1995). Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Arch Dev Biol* 204, 284-307.

Karagiosis, S. A. and Ready, D. F. (2004). Moesin contributes an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor morphogenesis. *Development* 131, 725-32.

Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G.M., and Bate, M. (1997). The origin, location and projections of the embryonic abdominal motoneurons of *Drosophila*. *J Neurosci* 17, 9642-9655.

Lee, T. and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22, 451-461

Paglini, G., Kunda, P., Quiroga, S., Kosik, K. and Caceres, A. (1998). Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons. *J Cell*

Biol 143, 443-55.

Pak, C. W., Flynn, K. C. and Bamberg, J. R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci* 9, 136-47.

Pearson, M.A., Reczek, D., Bretscher, A., and Karplus, P.A. (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101, 259-270.

Polesello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P. and Payre, F. (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol* 4, 782-9.

Polesello, C., and Payre, F. (2004). Small is beautiful: what flies tell us about ERM protein function in development. *Trends Cell Biol* 14, 294-02.

Nakamura, F., Amieva, M.R., Hirota, C., Mizuno, Y., and Furthmayr, H.

(1996). Phosphorylation of 558T of moesin detected by site-specific antibodies in RAW264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

226, 650–656.

Nakamura, F., Amieva, M.R., and Furthmayr, H. (1995). Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J. Biol. Chem.* 270, 31377–31385.

Neisch, A. and Fehon, R. G. (2008). FERMIing up the plasma membrane. *Dev Cell* 14, 154-6.

Newsome, T. P., Asling, B. and Dickson, B. J. (2000). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* 127, 851-860

Speck, O., Hughes, S. C., Noren, N. K., Kulikaukas, R. M. and Fehon, R. G. (2003). Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* 421, 83-7.

St. Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3, 176-88.

Takeuchi, K. et al. Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J. Cell Biol.* 125, 1371–1384 (1994).

Tsukita, Sa., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, A. Kawai, and Sh. Tsukita. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 126, 391–401.

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

Zipursky, S. L., Venkatesh, T. R., Teplow, D. B. & Benzer, S. (1984). Neuronal development in the *Drosophila* retina: monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell* 36, 15–26

圖表目錄：

圖一 Moesin 與 phosphorated Moe 在果蠅第 17 階段胚胎腹神經索的表現位置.....34

圖二 Phosphorated Moesin 在果蠅發育中胚胎腹神經索的表現位置.....35

圖三 pMoesin 於神經膠細胞上的分布.....36

圖四 利用 Elav-Gal4 與 Tublin-Gal4 大量表現不同構型的 Moesin 時，phosphorated Moesin 的效率.....37

圖五 大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞輕微影響神經軸突發育.....38

圖六 大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞導致軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例增加.....39

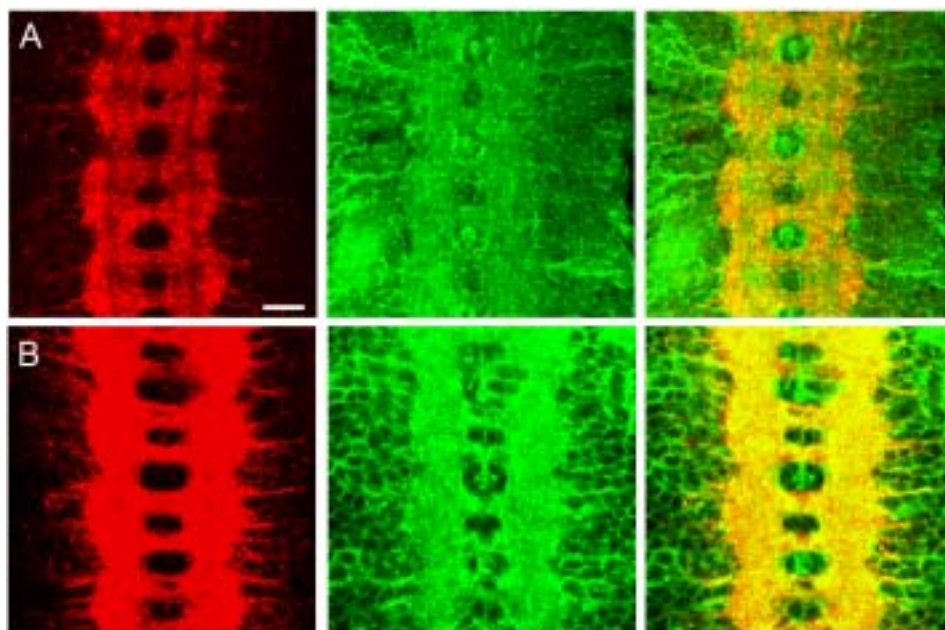
圖七 大量表現 MoesinT559D 於發育中全身細胞導致神經軸突發育不正常.....40

圖八 大量表現 MoesinT559D 於發育中全身細胞導致軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例顯著增加.....41

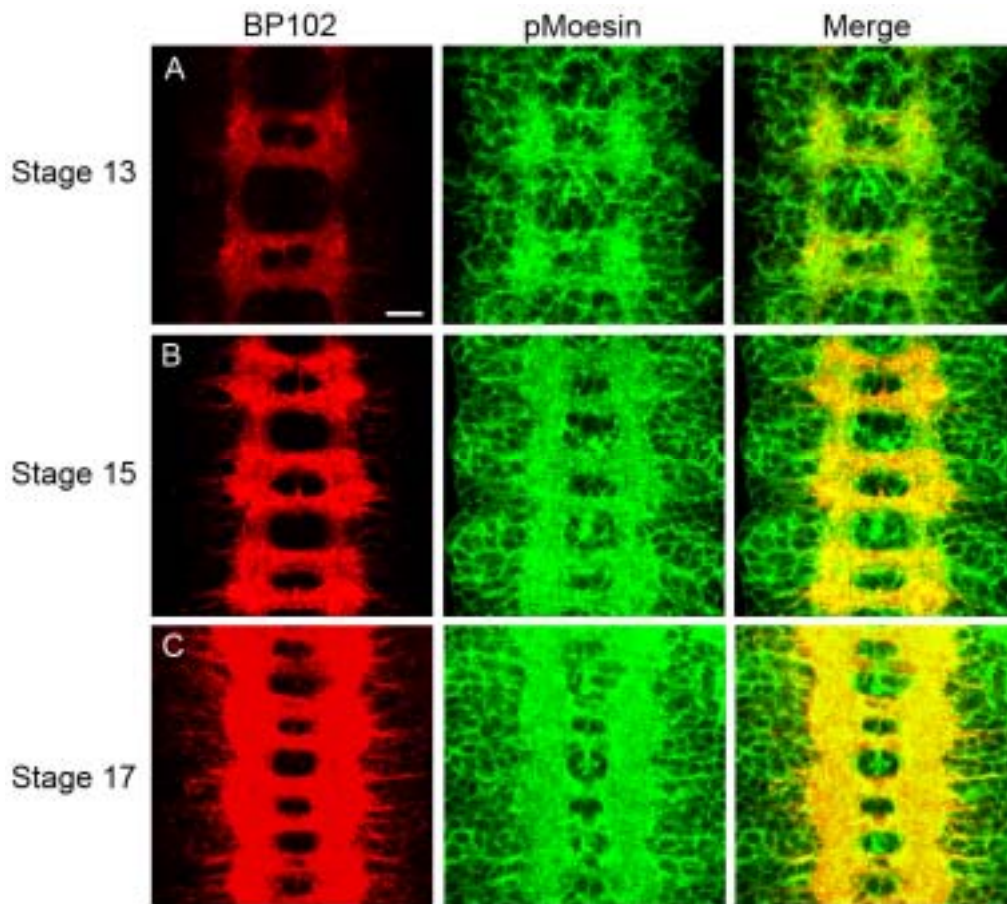
圖 九 大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞輕微影響神經
軸突發育.....42

圖 十 大量表現 MoesinT559D 於發育中全身細胞導致神經軸突
發育不正常.....43

圖 十一 大量表現 MoesinT559D 於發育中全身細胞導致神經膠
細胞分布不正常.....44



圖一 Moesin 與 phosphorated Moe (pMoe) 在果蠅第 17 階段胚胎腹神經索的表現位置。免疫螢光染色結果顯示，(A) Moesin (綠) 均勻分布於腹神經索上的細胞中。(B) pMoe (綠) 主要集中分佈於軸突骨架與神經細胞的膜上。Anti-BP102 抗體標定軸突的骨架，以紅色顯示。游標尺=10 μ m。



圖二 Phosphorated Moesin (pMoe) 在果蠅發育中胚胎腹神經索的表現位置。免疫螢光染色結果顯示，隨著果蠅胚胎不同的發育階段 (A) 第 13、(B) 第 15 與 (C) 第 17 階段，pMoe (綠) 有不同的表現位置。圖中紅色顯示 anti-BP102 代表神經軸突的骨架，pMoe 分佈與神經軸突的骨架有關係。游標尺 =10 μ m。

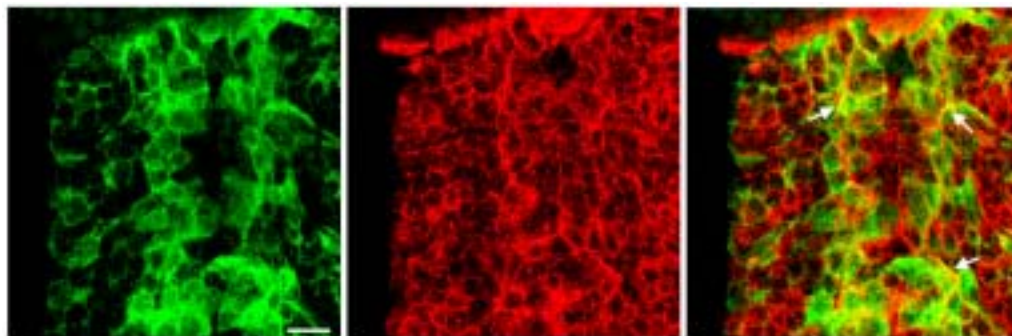
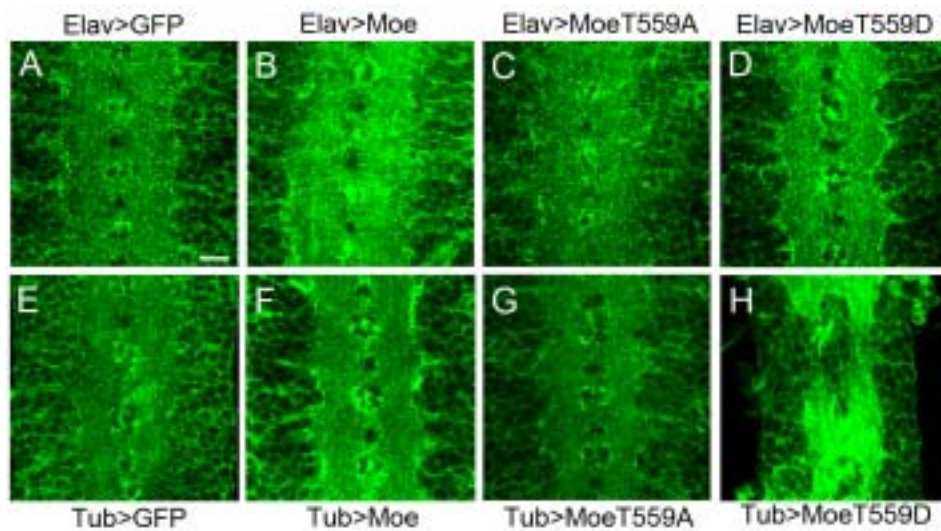
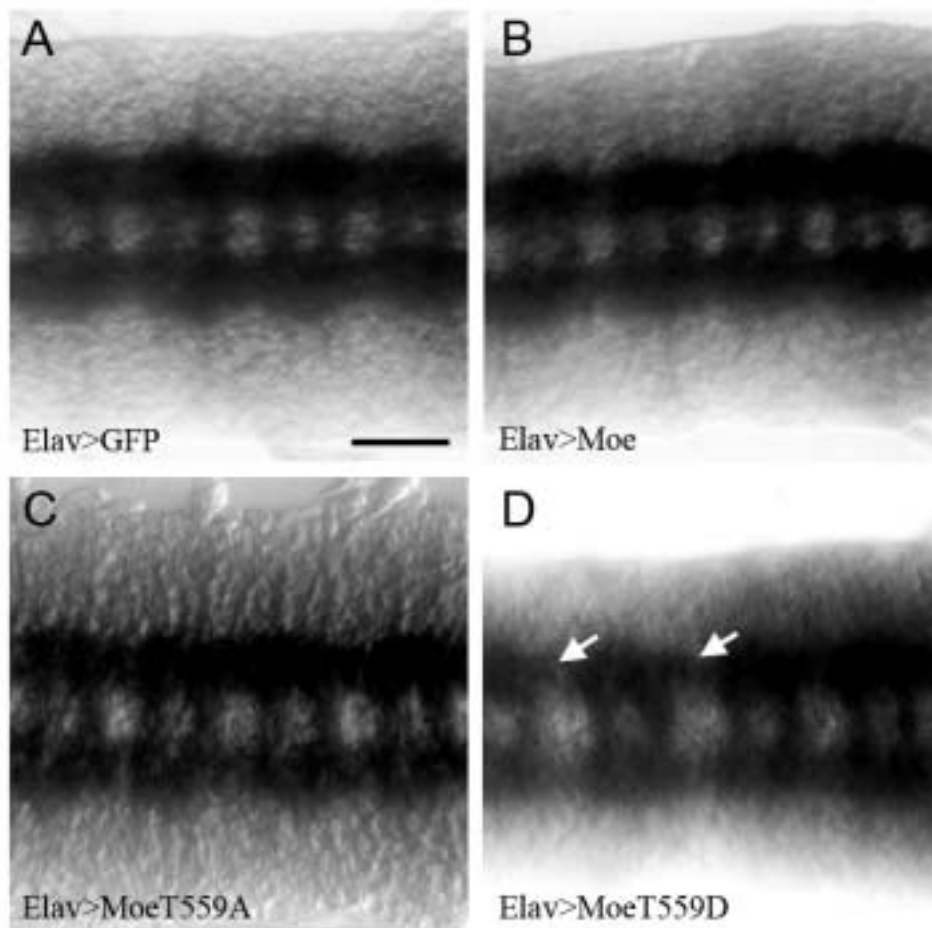


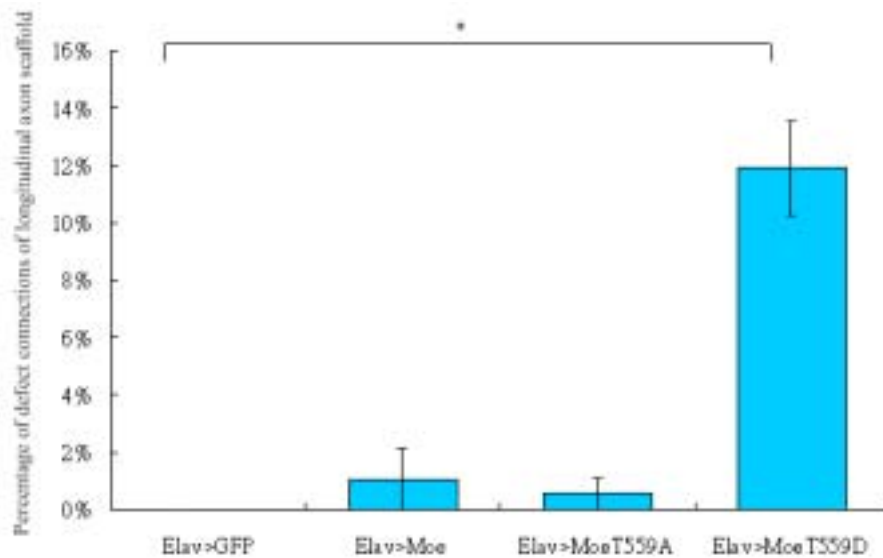
圖 三 Phosphorated Moesin (pMoe) 於神經膠細胞上的分布。第 17 階段胚胎腹神經索中，免疫螢光染色結果利用共軛焦顯微鏡 Z 軸堆疊掃描 10 μ m 厚度，每 2 μ m 一張堆疊而成的圖。綠色顯示為利用 Gcm-Gal4 (Glial cells missing) 表現 mCD8GFP 代表神經膠細胞膜。紅色顯示 pMoe 分布的位置。箭頭所指地方表示 pMoe 表現於神經膠細胞膜上多處的 pMoe。游標尺=10 μ m。



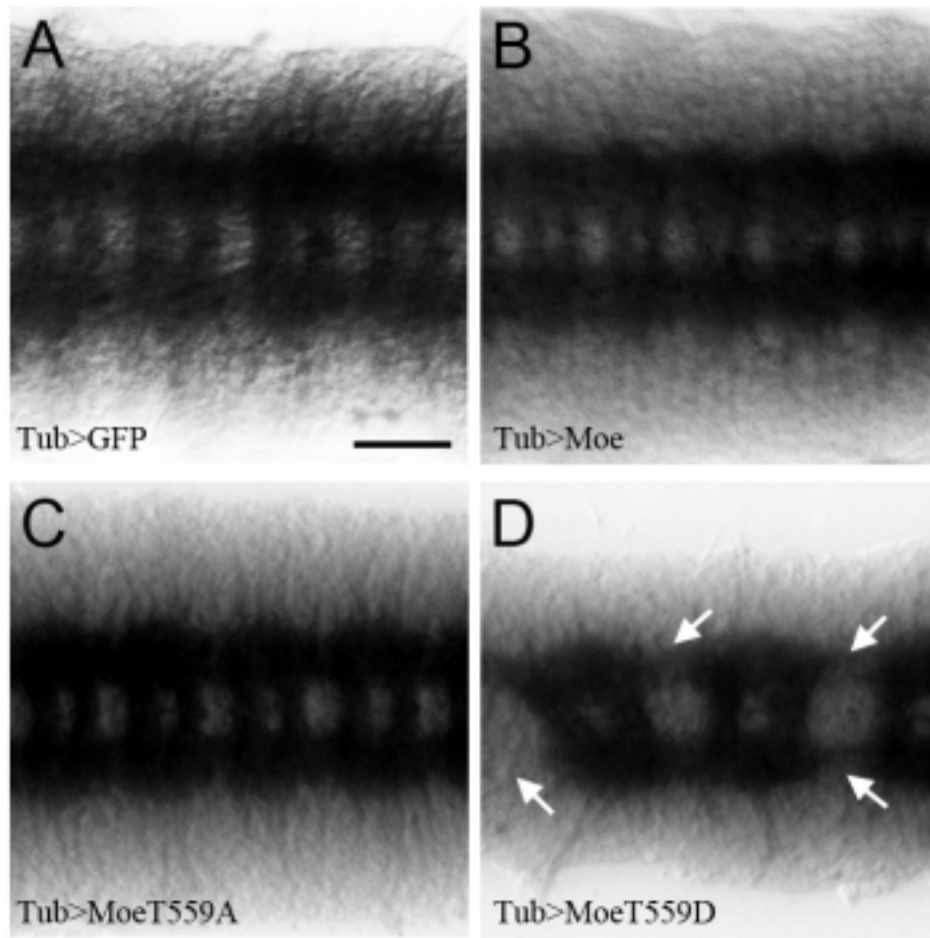
圖四 第 17 階段胚胎腹神經索中，利用 Elav-Gal4 與 Tubulin (Tub)-Gal4 大量表現不同構型的 Moesin 時，phosphorated Moesin (綠) 的效率。A~D，Elav-Gal4 分別大量表現 GFP、Moesin 全長、MoesinT559A 與 MoesinT559D。當 Elav-Gal4 大量表現 Moesin 全長與 MoesinT559D 於發育中神經細胞時 pMoe 的表現量也增加。E~H，Tub-Gal4 分別大量表現 GFP、Moesin 全長、MoesinT559A 與 MoesinT559D。當 Tub-Gal4 大量表現 Moesin 全長與 MoesinT559D 於全身細胞時 pMoe 的表現量也增加。且 Tub-Gal4 大量表現 MoesinT559D 時，pMoe 的表現主要累積於神經軸突上。游標尺=10 μ m。



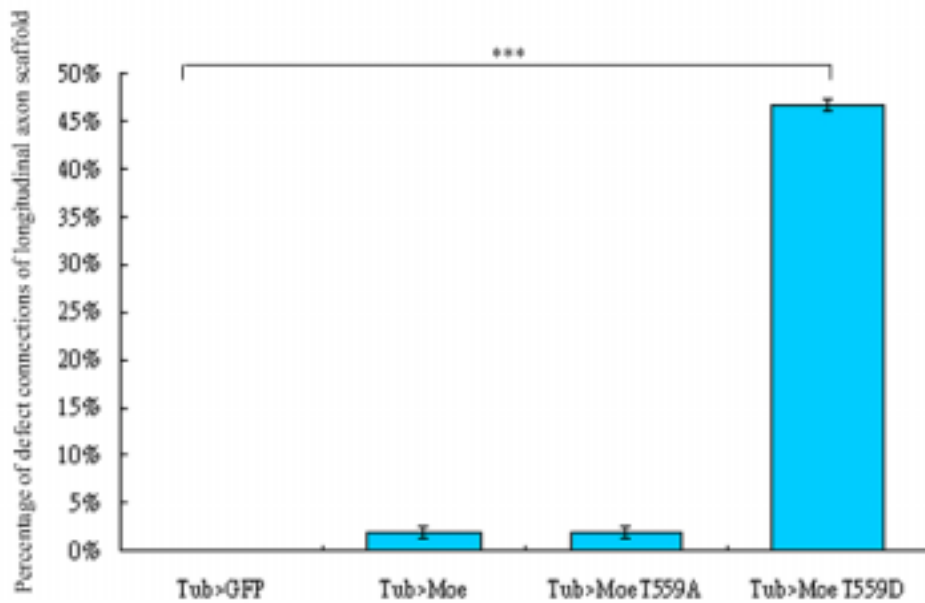
圖五 第 17 階段胚胎腹神經索中，大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞輕微影響神經軸突發育。A~D 分別利用 Elav-Gal4 大量表現 GFP、Moesin 全長、MoesinT559A 與 MoesinT559D 於發育中神經細胞。大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞導致軸突骨架縱向連接輕微地減少如箭號所指。游標尺=20 μ m。



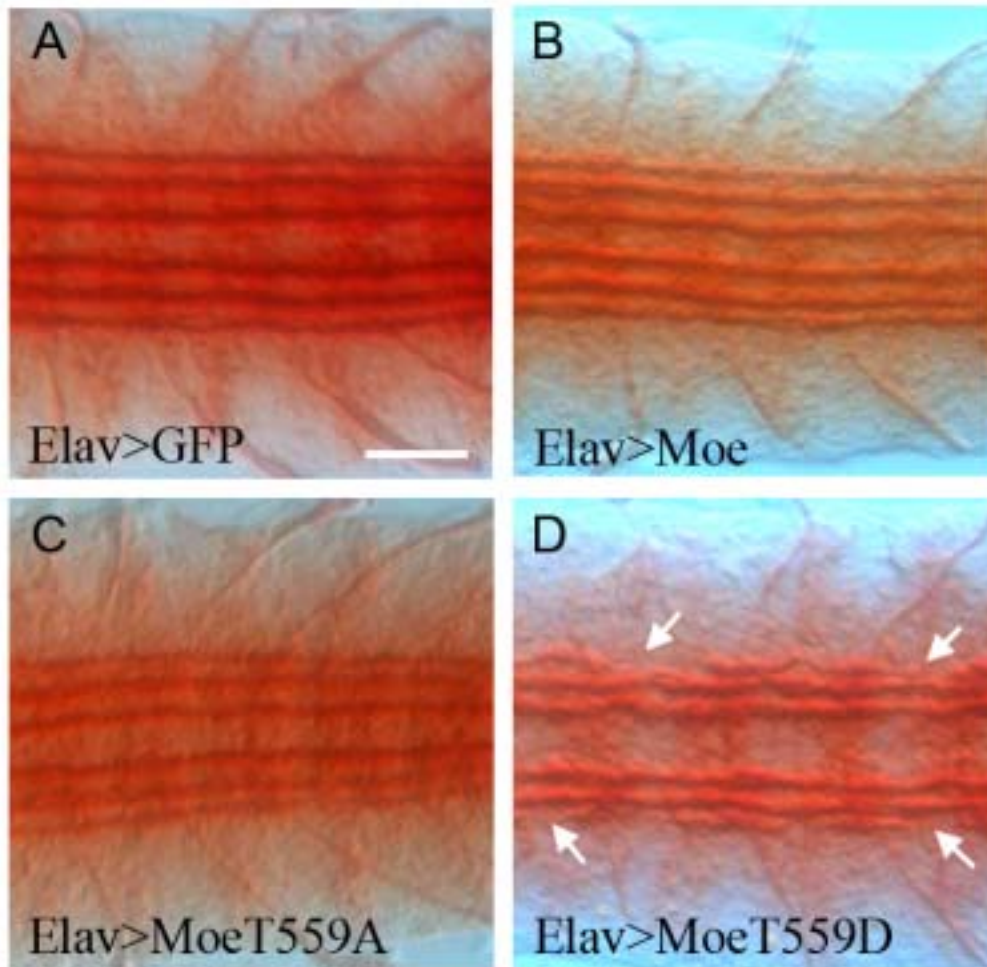
圖六 第 17 階段胚胎腹神經索中，大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞導致軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例增加。X 軸顯示四種果蠅。Y 軸為軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例。統計結果顯示，在控制組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例為 0%。在 Elav>MoeT559A 與 Elav>Moe 組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例皆分別為 1.12 % 與 0.56%。在 Elav>MoeT559D 組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例為 11.91%。且 Elav>MoeT559D 組與對照組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例有顯著差異 (p value=0.01869)。



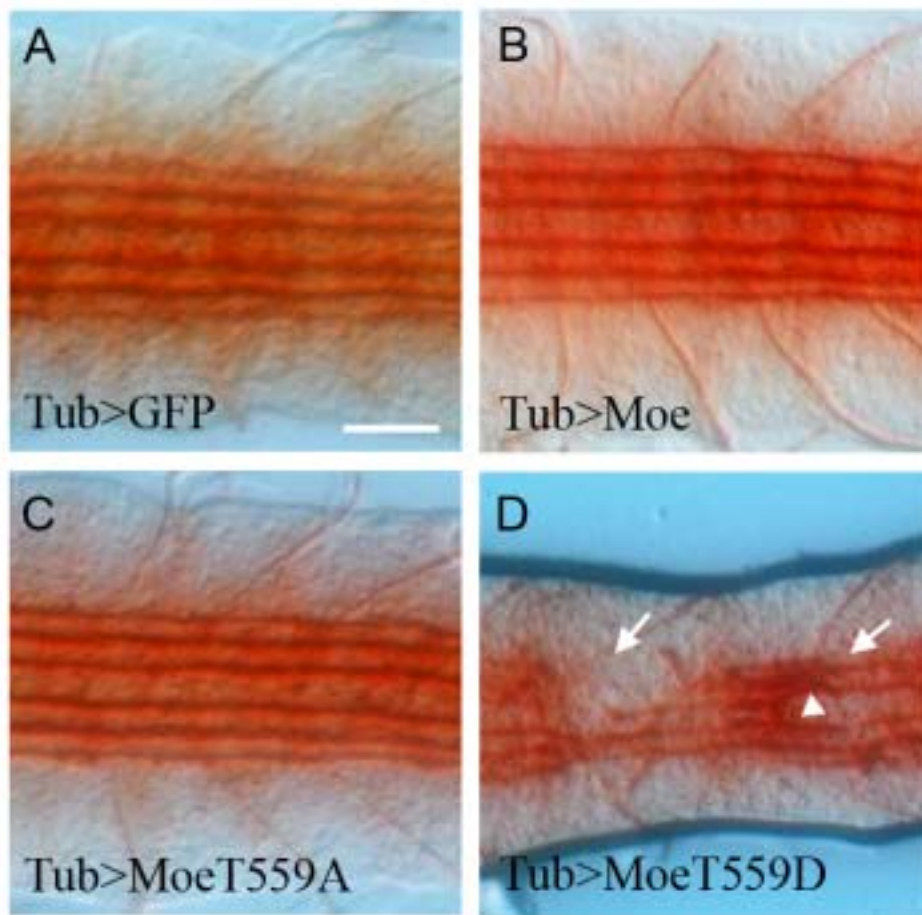
圖七 第 17 階段胚胎腹神經索中，大量表現 MoesinT559D 於發育中全身細胞導致神經軸突發育不正常。A~D 分別大量表現 GFP、Moesin 全長、MoesinT559A 與 MoesinT559D 於果蠅胚胎全身細胞。大量表現 MoesinT559D 於發育中全身胚胎細胞導致神經軸突骨架縱向連接顯著地減少如箭號所指。游標尺 =20 μ m。



圖八 第 17 階段胚胎腹神經索中，大量表現 MoesinT559D 於發育中全身細胞導致軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例顯著增加。X 軸顯示四種果蠅。Y 軸為軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例。統計結果顯示，在控制組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例為 0 %。在 Tub>Moe 組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例為 2.00%。在 Tub>MoeT559A 組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例為 2.00%。在 Tub>MoeT559D 組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例為 46.67%。且 Tub>MoeT559D 組與對照組軸突骨架縱向連接不正常降低之節數比例有顯著差異 (p value=0.006321)。



圖九 第 17 階段胚胎腹神經索中，大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞輕微影響神經軸突發育。A~D 分別利用 Elav-Gal4 大量表現 GFP、Moesin 全長、MoesinT559A 與 MoesinT559D 於發育中神經細胞。大量表現 MoesinT559D 於發育中神經細胞導致側向神經束 (lateral fascicle) 連接減少 如箭號所指。游標尺=20 μ m。



圖十 第 17 階段胚胎腹神經索中，大量表現 MoesinT559D 於發育中全身細胞導致神經軸突發育不正常。A~D 分別大量表現 GFP、Moesin 全長、MoesinT559A 與 MoesinT559D 於果蠅胚胎全身細胞。大量表現 MoesinT559D 於發育中全身胚胎細胞導致三條主要神經束連接減少如箭號所指與不正常的越過中線如箭頭所指。游標尺=20 μ m。

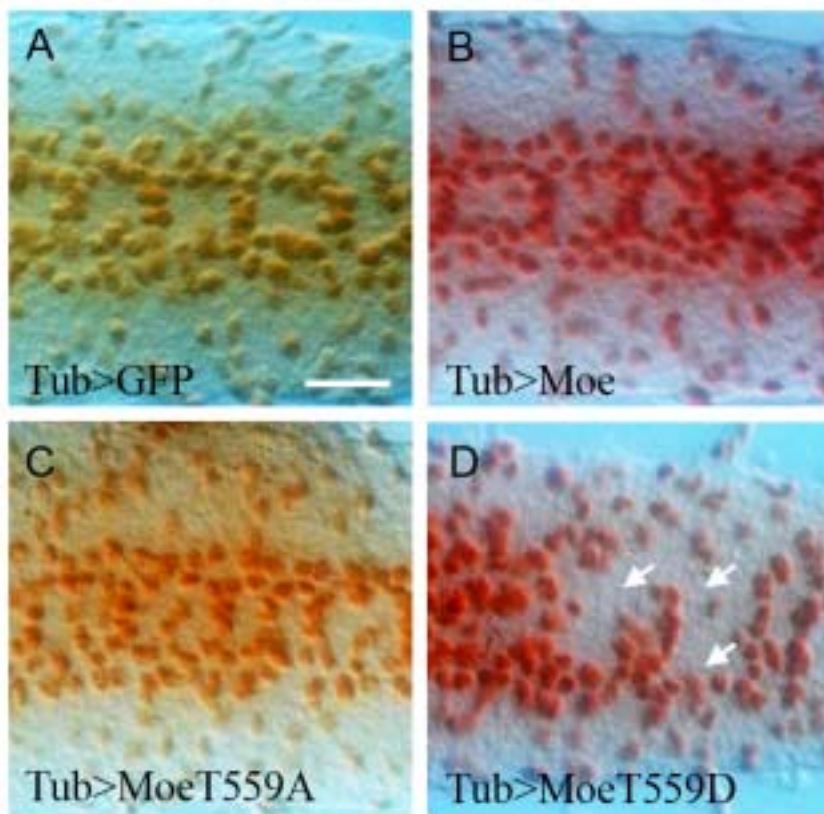


圖 十一 第 17 階段胚胎腹神經索中，大量表現 MoesinT559D 於發育中全身細胞導致神經膠細胞分布不正常。A~D 分別大量表現 GFP、Moesin 全長、MoesinT559A 與 MoesinT559D 於果蠅胚胎全身細胞。大量表現 MoesinT559D 於發育中全身胚胎細胞導致神經膠細胞於某些區域的數目減少如箭號所指。游標尺 =20 μ m。

姓名: 林育玟

籍貫: 台灣嘉義縣

性別: 女

出生日期: 1985 年 1 月 15 日

戶籍地址: 嘉義縣梅山鄉中華街 158 巷 3 弄 30 號

學歷: 國立嘉義女子高級中學

私立東海大學學士

私立東海大學生命科學系碩士生物醫學組

經歷: 私立東海大學遺傳生物學實驗助教

私立東海大學人類解剖學實驗助教