

## 目錄

目錄.....	1
中文摘要 .....	2
Abstract .....	4
前言 .....	6
一、 果蠅眼睛的發育 .....	6
二、 Tricornered (Trc)蛋白的研究 .....	9
材料與方法 .....	19
一、 果蠅的品系 .....	19
二、 果蠅眼睛的解剖與 phalloidin 的染色.....	21
三、 共軛焦螢光顯微鏡掃描攝影技術.....	24
結果.....	26
一、 果蠅成蟲眼睛表面的觀察.....	26
二、 果蠅三齡蟲期眼碟細胞構造的形態觀察.....	27
三、 於果蠅蛹期不同發育階段的眼形態構造之觀察.....	28
討論.....	32
一、 Tricornered(Trc)蛋白在果蠅眼睛形態發生上的調控角色.....	32
二、 Trc 與 Dmob2 對果蠅眼睛形態生成上的調控功能.....	34
參考文獻.....	38
圖目.....	46
個人資料.....	54

## 中文摘要

果蠅的 *tricornered* (*trc*) 基因編碼出一個 nuclear Dbf2-related (Ndr) serine/ threonine protein kinase，該蛋白質屬於一個在酵母菌、果蠅、線蟲以及哺乳類動物當中，均具有高度保留的蛋白質家族。先前的研究顯示，*trc* 突變會導致上皮毛髮與剛毛的畸形。由遺傳學研究結果發現，果蠅的 *trc* 會與 *furry* (*fry*) 作用，調控感覺神經樹突的分支以及貼覆作用的完成。除此之外，在生物化學與遺傳學上的研究結果顯示，Hippo 可使 Trc 磷酸化而有具活性，並且具有調節與維持樹突的貼覆的功能。總合來說，結果指出 Trc 在細胞的形態生成與極性的決定上，均扮演著關鍵的角色。先前的研究結果顯示，Trc 會與果蠅中的 Mob2 蛋白 (Dmob2) 產生鍵結關係。Dmob2 表現的位置在發育的感光細胞中，subrhabdomere 的區域。利用 RNA 干擾，降低 Dmob2 蛋白質的表達，會使感光細胞中的 rhabdomere 形態受損。該發現顯示 *Dmob2* 在感光細胞形態生成的重要性。在本研究當中，我們目的欲探討，是否 Dmob2 的結合蛋白—Trc 在果蠅的眼睛發育過程中也會有所影響？為達到此研究目標，我們使用已建構的兩種轉殖基因果蠅，其一品系為表現完整的 Trc 蛋白，另一品系的果蠅為失去磷酸酶活性的 Trc ( S288A and

T449A, Trc-KD), 作為 dominant negative 的對偶基因組。然後, 我們使用在眼睛組織專一表達的活化子, 稱作 *GMR-Gal4*, 將這兩組轉殖基因大量地表現在發育的眼睛組織當中。藉由 phalloidin 的染色結果, 以 *GMR-Gal4/UAS-Trc* 與 *GMR-Gal4/UAS-Trc-KD* 比較兩者之間果蠅眼睛表現型的不同。我們的研究結果顯示, 在 *GMR-Gal4/UAS-Trc* 的果蠅眼睛並無發現顯著的缺陷。而 *GMR-Gal4/UAS-Trc-KD* 的果蠅從 35% 蛹期眼睛的細胞排列中, 就開始出現明顯的缺陷。然而由發現結果推測, Trc 在果蠅眼睛發育過程可能扮演著重要的角色。未來我們實驗室後續會使用 *trc-RNAi* 以及當 *trc* 基因完全失去功能時(*trc* null mutant)的果蠅, 來研究其眼睛的表現型, 以確認 Trc 在眼睛發育上所扮演的角色。

## Abstract

*Drosophila tricornered* (*trc*) encodes the nuclear Dbf2-related (Ndr) serine/threonine protein kinase, which belongs to a highly conserved protein family found in yeast, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* and mammals. Previous studies show that mutation of *trc* lead to malformation in epidermal hairs and bristles. The genetic studies showed that *Drosophila trc* had been also known to act with *furry* (*fry*) to regulate sensory dendrites tiling and branching. In addition, biochemical and genetic studies showed that Hippo activates Trc phosphorylation and regulates dendritic tiling and maintenance. Together, these results indicate that Trc plays a critical role in cellular morphogenesis and polarity determination. Previous studies show that Trc physically binds to *Drosophila* Mob2 (*Dmob2*). *Dmob2* is localized at the subrhabdomere domain of developing photoreceptor cells. Using RNA interference to downregulate *Dmob2* expression, the rhabdomere formation is impaired in photoreceptor cells. These observations indicate the importance of *Dmob2* in photoreceptor morphogenesis. In this study, we attempted to study whether the *Dmob2* binding partner, Trc, has any effects in eye development. To achieve this goal, we generated two transgenic flies which express full-length Trc and kinase-dead Trc (S288A and T449A, Trc-KD) as dominant negative alleles. We then expressed the two

transgenes using eye-specific activator, *GMR-Gal4*, in developing eyes. We then used phalloidin staining to compare the eye phenotypes between *GMR-Gal4/UAS-Trc* and *GMR-Gal4/UAS-Trc-KD* flies. No obvious defects were found in *GMR-Gal4/UAS-Trc*. Our results showed that eye defects became evident in *GMR-Gal4/UAS-Trc-KD* beginning at 35% of pupal development. This observation suggests that Trc may play an important role in eye development. In the future, we will generate Trc antibody to study its subcellular localization in photoreceptor cells. The follow up of our lab will study the eye phenotypes in *trc-RNAi* or *trc* null mutant fly to confirm the role of Trc in eye development.

## 前 言

### 一、 果蠅眼睛的發育

果蠅成蟲的眼睛結構上具有一對複眼，每個複眼約由 750-800 個小眼(ommatidia)所組成。外觀上，每個小眼(ommatidium)均呈規則的六邊形，緊密相連，並且周圍有細小的剛毛(bristle)構造。每一個小眼當中，含有 8 個感光細胞(photoreceptor cells/ R cells)，4 個錐體細胞(cone cells)，2 個初級色素細胞(primary pigment cells)，6 個二級色素細胞(secondary pigment cells)，3 個三級色素細胞(tertiary pigment cells)，以及 3 個與感覺機械性震動有關的剛毛細胞(bristle cells)所形成的一個剛毛複合體共同組成。因此，果蠅每個小眼當中，由總數大約是 23~26 個細胞所構成。其中，8 個感光細胞分別被命名為 R1-R8。除了 R1-R6 依序排列，以成為一個梯形的分布之外，R7 與 R8 均位於梯形排列的中央。在眼睛整體構造中央的上半部為 R7，而 R8 位在 R7 的下半部 (Wolff and Ready, 1993)。

果蠅眼睛的發育，最早開始於胚胎時期，由一群上皮細胞的先驅細胞(大約20個細胞)，經歷一連串的發育過程後，所構成的觸角-眼碟(antenna-eye disc)構造而來。在一、二齡蟲期的眼碟當中，進行細胞增

生(cell proliferation)而非進行細胞分化(cell differentiation)。進入三齡蟲期的早期開始，眼碟會由後端(posterior)為眼睛細胞分化的最初始點，此區域的細胞開始聚集，未來會成為先驅細胞群(precursor cell clusters) (Ready *et al.*, 1976)。進入三齡蟲期的眼碟，會在表面形成一個凹槽狀的構造，稱為「形態生成溝」(morphogenetic furrow, MF)，逐漸地由眼碟的後方，往前方平行地移動，此為主要顯示正在進行細胞分化的指標。生成溝的前端區域(anterior)是仍然持續進行細胞分裂，但未進行分化的細胞。然而，緊連著生成溝的後端，較近的一排細胞，會先聚集成五個細胞的pre-clusters，細胞群緊接著以赤道線(equator)為鏡像對稱，一邊進行分化，一邊以45°為單位，作兩次的旋轉(rotation) (Mirkovic and Mlodzik, 2006)。越後方的區域，則是存在著已經分化越成熟的細胞。感光細胞的先驅細胞，先在生成溝的後方聚集與分化，分化的先後順序為：R8最先分化完成，接著分化出來的感光細胞，依序為R2/R5、R3/R4以及R1/R6，成對地完成分化，而R7則最晚分化完成。接著感光細胞週遭的4個錐體細胞逐漸分化，而外圍多層的色素細胞，經過相關分子調控的「計畫性細胞死亡」(programmed cell death)程序之後，逐漸成為單層的色素細胞，並且依序分化出初級、二級、三級的色素細胞與剛毛細胞(Wolff and Ready, 1993)。生成溝的前方區域，未來會發育形成成蟲的頭皮以及頭頂上的單眼。整個果蠅眼睛的

pattern formation過程，大約在進入蛹期之後的前1/3之後告一段落。

在進入三齡蟲期的形態生成溝後方，會形成一共9列的細胞，在後方已經分化好的感光細胞頂面，跟鄰近的錐體細胞以zonula adherens junction(ZA junction) 相互連結，兩種細胞的頂面均直接曝露在眼碟的表面。形成蛹之後的早期(37% pupal stage)，錐體細胞開始因彼此之間的細胞相互接近，而有閉合的現象，並使感光細胞的頂面向內面捲曲。從55%的蛹期開始，由細胞骨架組成多數皺褶的微絨毛(microvilli)，並且逐漸堆積在感光細胞的頂面上，在進入蛹期發育階段的最後，會發育形成卵圓形構造的桿小體(rhabdomere)。在形成蛹之後的晚期(大約67% pupal stage)，感光細胞的頂面向內面轉向90°，並且逐漸向下延伸，直到接觸到錐體細胞的底部(cone cell plate or feet)，形成細胞連結，而構成視網膜板。此時，R8感光細胞向內縮到R7的下方，而R8與R7的感光細胞頂面，以及R1-R6 的感光細胞頂面，彼此之間相對形成一個空隙，叫作inter-rhabdomere space (IRS)。然而，最後桿小體向下延伸到大約長度為100 $\mu$ m時，以形成果蠅成蟲眼睛的整體構造(Longley and Ready, 1995)。

## 二、 Tricornered (Trc)蛋白的研究

*tricornered(trc)*基因可以編碼出 Tricornered(Trc)蛋白，即為果蠅體內單獨存在的 Ndr 磷酸酶(Nuclear Dbf 2-Related)。Trc 蛋白含有 459 個胺基酸(*trc*-PA: long form)，蛋白質的大小約為 52 kDa。Trc 蛋白屬於 serine/ threonine 磷酸酶家族蛋白質的成員之一，參與果蠅正常形態生成與細胞極性生長的發育過程調控。Trc 蛋白又可以被次分類為 AGC 家族蛋白質的成員(Hergovich *et al.*, 2006)。大多數的 AGC (PKA/PKG/PKC-like) 家族蛋白質的共同特性，主要是均為具有 serine/ threonine 活化位點的磷酸酶，均需要在活化片段(activation segment, AS)先被磷酸化，然後由厭水端的重複胺基酸序列(hydrophobic motif, HM)使屬於該家族的蛋白質，可以得到完全地被活化，以行使蛋白質的調控功能(Manning *et al.*, 2002)。編碼出 Trc 蛋白質的 cDNA 序列，長度為 2126 個鹼基對(base pairs)，在 5' 端的 UTR (untranslated region) 存在 125 個鹼基對，而在 3' 端的 UTR 存在 621 個鹼基對，一共有 5 個 exons (Geng *et al.*, 2000)。前人研究指出，取得的果蠅體內 Trc 遺傳序列，位在緊接著 *deaf-1* 基因的下游 (downstream)處。而 Trc 依照 cDNA 序列長短的不同，有分為兩個形式，分別被稱為 *trc-L*(long- form; 登記編號為 AF238490)與 *trc-S* (short form; 登記編號為 AF239171)，由於兩者之間的蛋白質差距極微，只有在編碼出來的蛋白質當中，具有催化活性的

區域(catalytic region)有 5 個胺基酸的差別，推測在 alternative splicing 的過程中造成轉譯出的蛋白，具有活化區域上的些微差異，可能具有調控功能上的差別。但是，*trc-L* 與 *trc-S* 兩者所編碼出來的蛋白質，在主要調控功能上確切的差異，彼此之間有無作用上面的交互關係？或者是兩者的調控是呈現相同或是互補的功能？目前均尚未被明確地定義出來(Millward, Cron and Brian, 1995)。

在果蠅活體中的研究結果發現，Trc 蛋白需要藉由在 Ser/Thr 兩個位點都被磷酸化，才會產生活性。並且在 Ser292 與 Thr453 的兩個位點當中，至少其中之一突變為 Ala 時，都可以造成 Dominant negative 的對偶基因，使 Trc 蛋白得以持續地不被磷酸化而沒有活性(Emoto *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005)。當 *trc* 基因發生突變時，會導致果蠅上皮細胞所構成的上皮毛髮構造(epidermal hairs)，以及觸角尖端側面的構造(arista lateral)，均出現聚集成群(clustered)或分裂的(split)的表現型。造成觸角的毛以及剛毛細胞，發生分裂或畸形的不正常形態(Geng *et al.*, 2000)。當 *trc* 基因發生突變時，在三齡蟲的感覺神經細胞樹突(dendrites)的末梢會產生過度的分支、樹突末梢分支之間的重疊區域數目，明顯地變得比野生種(wild type)多的表現型(Emoto *et al.*, 2004)。

同樣屬於 serine/threonine 磷酸酶家族成員的蛋白質有很多，廣泛地分布在許多不同的物種當中，像是哺乳類動物、酵母菌、果蠅、線蟲以及某些真菌等生物，顯示該家族的蛋白質，具有結構上以及功能上很高的保留性。在 serine/threonine 磷酸酶的蛋白質 N 端有一段 N terminal region ( NTR )，在具有催化活性的調控區域(catalytic domain) 又可以分為 9 個次分類區域(subdomain)。其中，最主要的調控區域在 subdomain VII 與 VIII，兩者之間有一個活化片段(activation segment, AS)，serine 活化位點位在活化片段上。而在活化片段的上游，有一段 ”自我抑制片段”( auto-inhibitory segment, AIS )，會抑制 serine/ threonine 磷酸酶的自我磷酸化。在 C 端則具有厭水重複序列(hydrophobic motif, HM)，而 threonine 的磷酸化位點位於 HM 上(Hergovich *et al.*, 2006)。

研究顯示，當在線蟲(*Caenorhabditis elegans*)中的 *ndr* 基因(*sax-1*) 發生突變時，會造成類似 *trc* 基因發生突變後的表現型，呈現在神經細胞當中，樹突分枝數目變多的形態(Zallen *et al.*, 2000)。在酵母菌中的 *ndr* 基因，分別是:在出芽生殖的酵母菌(*Saccharomyce cerevisiae*)中轉錄成 Cbk 1 蛋白的基因，該基因發生突變時，會促進 Ace2p 轉錄因子在細胞核中的位置轉換，以控制出芽生殖的細胞生成。造成由母細胞長出的芽(bud)，即是子細胞的芽軸線，生成失敗(Weiss *et al.*, 2002)。然

而，在 *Schizosaccharomyces pombe* 中的 *orb6* 基因發生突變時，也會造成子細胞生成的芽軸線生成失敗(Verde *et al.*, 1998)。在一種真菌類---*Neurospora* 當中，*cot1* 基因為 *trc* 基因的同源物，當 *cot1* 產生突變時，會造成 hyphal 分枝急遽地增加(Yarden *et al.*, 1992)。顯示 *ndr* 基因的同源物，存在不同物種當中的調控功能，均與細胞極性的正常形成有關。

已知的研究顯示，人類以及老鼠等哺乳類動物的基因組，具有 *ndr1* 與 *ndr2* 基因，分別會編碼出兩個高度相近的 serine/ threonine 磷酸酶，各別是 Ndr1 (nuclear Dbf2- related kinase 1, 又叫作 serine/threonine kinase 38 或 STK38) 與 Ndr2 (又叫作 serine/threonine kinase 38 like-protein, STK38L)，兩者蛋白的相似度高達約 86 %，兩者均也被次分類為 AGC 家族蛋白，與蛋白質磷酸酶 B (protein kinase B, PKB) 以及 PKC，有部分的序列相似(Hergovich, Bichsel, and Hemmings, 2005)。然而，由前人的研究結果顯示，經由 okadaic acid (OA) 去抑制蛋白質去磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A) 的活性，均會造成人類的 NDR 蛋白，以及酵母菌的相應物—Dbf-2，出現急遽地活化的現象。證實 NDR 磷酸酶是經由被磷酸化，來進行調控使 NDR 具有活性的作用(Mah, Jang, and Deshaies, 2001; Millward, Hess, and Hemmings, 1999)。

對NDR1來說，在Ser281的位置，具有鈣離子依賴性( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent)的自我磷酸化(auto-phosphorylation)特性，而Thr444的位置則為具有厭水性重複序列的磷酸酶所磷酸化。整體來說，Ser281與Thr444兩個位點的磷酸化，均為NDR1活性的完全活化所必要的(Tamaskovic *et al.*, 2003)。然而，NDR2的磷酸化活性，則是需要Ser282與Thr442兩個位點均被磷酸化，才得以被完全地活化 (Stegert *et al.*, 2004)。而NDR2蛋白，在由小鼠大腦中的杏仁核(amygdala)取得的神經細胞，進行培養的相關研究當中，得知NDR2與形成神經突 (neurites) 相關構造的細胞骨架主要成分之一——肌動蛋白(actin)，藉由細胞之間的相接觸點，而有所連結。由大鼠的PC 12細胞(PC 12 cell, rat pheochromocytoma cell)，稱做”嗜鉻神經瘤”，是一種取自於果蠅交感神經系統的神經腫瘤細胞。利用細胞培養的實驗，以Ndr2蛋白在PC 12細胞當中表達，以及表達在Ser282/Thr442雙重點突變的Ndr2蛋白，在均不加入神經生長因子(nerve growth factor, NGF)的情況下，與控制組相比較。在細胞培養後的第三天，量化各組細胞所生長出的神經突(neurite)數量。研究結果發現，Ndr2蛋白質會促進PC 12 細胞株的神經突生長，顯示NDR2為參與調控神經細胞構造分化的候選分子之一 (Stork *et al.*, 2004)。又已知Mob (Mps-one binder)家族蛋白在人類的細胞當中，可以迅速地藉由把NDR往細胞膜的內面聚集，並且協助NDR蛋白的磷酸化，使NDR

具有活性(Hergovich, Bichsel, and Hemmings, 2005)。而人類的NDR蛋白與果蠅的Trc蛋白有將近80%的相似度(similarity)，兩者的cDNA序列，預計編碼出來的蛋白質大小也相近，分別約為54 kDa與52kDa。其中，與基因序列相似度最高的，是人類當中的*ndr1*。整體cDNA序列上有68%的相同度(identity)，而在具有催化活性的區域，則具有77%的相同性(Millward, Cron and Brian, 1995)。

Trc 蛋白與 Furry (Fry)蛋白互為在功能上，具有交互作用的夥伴蛋白(He *et al.*, 2005)。而 Trc 與 Fry 兩者各自的家族蛋白，在許多物種當中，均具有高度保留的序列與功能性。Trc 與 Fry 兩者共同作用後，主要的功能在於調控細胞的形態發育，以及維持細胞極性的正常生成。當 *trc* 基因發生突變時，在果蠅的觸角側面 (arista laterals) 會出現改變所有肌動蛋白(actin)與微導管(microtubule)分布的現象(He and Adler, 2001)。前人利用 MRCAM 的研究結果顯示，當 Trc 或 Fry 發生突變時，會造成三齡蟲期果蠅的感覺神經細胞樹突末梢，有分枝變多，並且有分枝與分枝之間的重疊位置，總數目變得遠比野生種多的表現形態(Emoto *et al.*, 2004)。由 Trc 與 Fry 失去功能(loss-of-function)的表現形態研究結果，可歸納出 Trc 與 Fry 的訊息傳導機制，是利用 Trc 蛋白參與 Rac GTPase 相關的作用途徑，以調控限制神經元樹突末梢分支數量

變多的功能，並且藉由 Fry 正向調控 Trc，以促進同源神經元彼此之間的分佈範圍，具有互斥的現象(like-repel-like) (Emoto *et al.*, 2004)。然而，在前人的研究結果證實，Trc 需要被磷酸化才會具有活性，並且可與 Furry 共同作用，而對果蠅翅膀上毛髮構造的發育，具有調控的功能 (He *et al.*, 2005)。

而在果蠅體內，又有另外一個參與神經細胞正常生成的調控蛋白質，稱做為 Hippo。Hippo(Hpo)是屬於腫瘤抑制因子(tumor suppressor)的磷酸酶，經過使用”共同免疫沉澱法”(coimmuno-precipitation, CoIP)，以及”西方點墨法分析”(Western blotting)的生物化學實驗結果證實，Hippo確實與Trc具有直接的交互作用關係。並且主要是利用 Hippo 蛋白的C端與Trc有直接鍵結的關係(Emoto *et al.*, 2006)。在果蠅體內，當Hippo發生突變時，會造成三齡蟲期的感覺神經，其樹突末梢分枝的數目變多，以及樹突末梢的分枝之間，交疊的區域變多的缺陷(defects)。由Kinase assay的實驗程序，先使用西方點墨分析法，將代表著不同蛋白質大小亮紋(band)的Trc蛋白，藉由偵測 $P^{32}$ 放射線同位素定量的方法，來觀測具有磷酸化的Trc蛋白所含的量。結果顯示，Hippo會磷酸化Trc，特別是藉由Trc的Thr449位點進行磷酸化。但是，Hippo對於Trc的另一個位點---Ser292的磷酸化程度，則影響較少(Emoto *et al.*,

2006)。

前人研究指出，在果蠅活體內，特定的 Mob 蛋白可與多種磷酸酶之間有交互作用。而在哺乳類動物中的研究，特定的 NDR 家族磷酸酶可與多種 Mob 蛋白有直接鍵結的交互作用。在果蠅的體內，由免疫螢光染色的技術去作的研究結果顯示，Trc 蛋白與 Dmob2 蛋白的次細胞 (subcellular) 分布位置有重疊的現象。均是位在翅膀細胞的細胞邊緣，以及翅膀細胞所形成的突出毛髮構造上 (He *et al.*, 2005)。更進一步地，在試管中的研究結果，推測在果蠅體內，Trc 蛋白在 119-180 的胺基酸序列位置，與 Mob 家族蛋白當中的 Dmob2 有直接的鍵結 (He *et al.*, 2005)。然而，前人研究也已經知道，在哺乳類動物的細胞中，Mob 家族蛋白可以藉由迅速把 NDR 聚集到細胞膜的內面，進行磷酸化調控 (Hergovich *et al.*, 2005)。

因此，總和以上的研究結果，推測出在果蠅體內，Trc 蛋白所屬的調控作用途徑，即是在 Trc 蛋白上游，Hippo 先受不知名的上游分子，磷酸化之後而具有活性，與 Trc 蛋白有直接的鍵結關係，並且 Trc 受到 Hippo 的磷酸化，而具有活性 (Emoto *et al.*, 2006)。Mob2 蛋白為 Trc 的共同活化子 (co-activator)，可以促進 Trc 的被磷酸化，使 Trc 具有磷酸

化下游分子的活性。目前，Trc 下游的調控目標分子並不清楚。但已知最終的調控結果，是對神經細胞的正常生長與上皮細胞的極性生成，具有關鍵性的維持作用(Hergovich *et al.*, 2008)(附圖一)。

果蠅的上皮細胞在形成過程中，分別具有在生物化學上以及細胞結構上，可以明顯區分的區域。分別是位在細胞膜的頂面與細胞本體的細胞膜底面(basal/ lateral)，代表不同的極性區域。上皮細胞的共同特點，是在頂面的膜上，具有微絨毛(microvilli)或是其他細胞的突起部分。因此，細胞極性的決定，在發育的過程中，扮演著很重要的角色(Eaton, 1997)。從前人的研究經驗得知，果蠅的蛹期發育階段，在未來會形成翅膀的構造上，具有一種稱做”pre-hair”的上皮細胞，具有未來分化成成蟲時，會向外延伸的毛髮構造。”pre-hair”上皮細胞，佈滿著肌動蛋白(actin)與微導管(microtubule)等組成的細胞骨架(Turner and Adler, 1998)。因此，”pre-hair”細胞最常被用來觀察分子對上皮細胞的調控作用(Wong and Adler, 1993)。

而剛毛細胞 (bristles)、觸角側端 (arista laterals) 等上皮細胞生成的構造，在 Trc 蛋白發生失去功能的突變後，會造成上皮細胞生成的毛髮構造出現分裂 (split) 的表現形態(Geng *et al.*, 2000, Gong *et al.*,

2001)。而施加藥劑 cytochalasin D (CD) 跟 latrunculin A，以抑制細胞骨架中的肌動蛋白增殖(proliferation)，除了會造成上皮細胞毛髮出現分裂的表現型之外，也會有剛毛細胞較為粗肥(fat)、短小(short)等較弱的表現型。推測 Trc 的作用目標是藉由影響肌動蛋白的功能，進而調控果蠅上皮細胞的形態生成(Geng *et al.*, 2000)。然而，在果蠅的眼睛發育過程，上皮細胞極性的決定也對果蠅眼睛構造的分化上，扮演著不可或缺的角色。在果蠅眼睛的感光細胞分化過程中，同時也參與著神經細胞的發育，未來得以將果蠅所接收到來自外界的視覺刺激，傳送到大腦當中。

在果蠅上皮細胞發育的過程當中，對細胞極性具有調控功能的 Trc 蛋白，在果蠅眼睛的形態生成上，是否也會扮演著重要的角色?目前尚未被仔細探討。而 Trc 蛋白在果蠅眼睛的發育過程中，在細胞形態的生成上，其確切的作用調控機制，目前仍尚不清楚。因此，我們研究的目標，主要在於探討 Trc 與 Trc DN (Dominant negative, 即是 Trc KD, Tricornered kinase dead) 即代表活性存在與否的 Trc，分別在果蠅眼睛大量表達時，觀察在各個不同的發育時期，在眼睛結構的生成上具有何種影響?藉此進一步地推測，Trc 在果蠅眼睛形態發育上的調控功能。

## 材料方法

### 一、 果蠅的品系

本研究以黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)為模式動物，使用 *GMR-GAL4* 品系的果蠅，並以 *UAS-GAL4* 系統進行實驗。*UAS-GAL4* 系統，最早是由酵母菌當中發展出來，在自然界的果蠅體內並不存在。GAL4 蛋白是從酵母菌之中，所分離出來的轉錄因子，上游會接一段基因序列，是為組織或細胞具有專一性的增強子(enhancer)。而 UAS (Upstream activating sequence) 為一段會被作出來的 GAL4 蛋白所結合上的基因序列，而 UAS 下游接一段目標基因的序列。當在一個果蠅體內同時具有這兩段基因的時候，可以控制在特定的時間，在特定的組織或細胞位置，大量地表現 GAL4 蛋白質，而 GAL4 蛋白會結合上 UAS 片段，並且促進下游目標基因的轉錄，使得目標基因所編碼的蛋白質，得以在特定的組織或細胞中大量地表達(Brand and Perrimon, 1993)。而 GMR (Glass multiple responding elements) 是一個啟動子片段 (promoter element)，在果蠅三齡蟲期的眼碟(eye disc)中，「形態生成溝」(morphogenetic furrow, MF) 的後方，從第二個有絲分裂波(second mitotic wave) 開始，到眼碟最後方，已具有分化功能的細胞區域，都是 GMR 專門合成與表現的位置(Freeman, 1996)。使用 *GMR-GAL4* 作為 Driver，可以將

我們所欲探討的蛋白質，從進入三齡蟲期，形態生成溝的構造出現開始，即大量地表現在果蠅眼睛組織的細胞當中。我們以*UAS-GFP*的果蠅品系作為控制組。由過去我們實驗室依照*trc-S form*的基因序列，所做出的轉殖基因果蠅。分別是*UAS-Trc*的轉殖基因果蠅，帶有可以將Trc蛋白完整地表達出來的基因序列。而*UAS-Trc KD*的轉殖基因果蠅，則是作出在可以表現Trc的調控區域(regulatory region) 上，Ser288 Ala跟Thr449Ala兩個位點發生點突變，將這兩個位點均取代成為alanine，造成Dominant negative的對偶基因，而有可以讓轉錄出的Trc呈現持續不被活化的狀態(He *et al.*, 2005)。

本實驗統一取用*GMR-GAL4*的公果蠅，分別與*UAS-GFP*、*UAS-Trc*以及*UAS-Trc KD*的處女蠅養在同一個飼養管當中。其中，公果蠅與處女蠅的數目比，大約為1:2，目的在獲得較多產下的子代。然而，*UAS-Trc*與*UAS-Trc KD*果蠅品系，均帶有平衡子(balancer)，目標使轉殖基因果蠅中的特定序列，可以更穩定地存在正確的位置。*UAS-Trc* 所帶的平衡子是 $\Delta/CyO; +/TM6B$ ，表示具有可以轉錄出*UAS-Trc*的基因是位在第二對染色體上，*CyO*是表現型為捲翅的平衡子，即是一定要挑直翅的處女蠅。然而，*UAS-Trc KD*果蠅品系的平衡子為  $+/CyO; 22SATA/TM6B$ 。其中22SATA，代表的是未來可以轉譯出Trc KD蛋白質的基因序

列，該品系表示，目標基因位在第三對染色體。而*TM6B*平衡子的表現型，是使原本在果蠅肩部只存在兩根較長的毛，變為較短且多根的毛。因此，即要挑肩部只有兩根毛，但是捲翅與直翅不拘的處女蠅備用。

*GMR-Gal4*品系的果蠅，帶有一對表達*GMR*的對偶基因(alleles)，屬於同型合子(homozygous)存在的果蠅品系。該品系當中，所有的果蠅，無論公母，均具有可以在光學解剖顯微鏡底下，直接用肉眼就觀察得到，眼睛表面的結構不平整、小眼不規則的不光滑Rough eye表現型。所有的果蠅均飼養於25°C的恆溫培養箱，並以果蠅培養基的玉米粉標準配方餵食。

## 二、 果蠅眼睛的解剖與 phalloidin 的染色

本研究主要是探討果蠅的三齡蟲期與三個不同蛹期的發育階段。在 25°C 的恆溫培養箱中，控制規律的日照之下，計算出從蛹期開始到形成羽化的成蟲，總共需要耗時約 93 小時，進而以此推算出不同發育階段的蛹期所需耗費的時數。

A.) 三齡蟲期的判斷，則是在成蟲果蠅，換到新的果蠅培養基瓶子當中，經過大約四天後，挑選爬上管壁較為肥大的幼蟲(larvae)，浸

泡入滴在解剖盤上的林格氏液(Ringer's solution: 55 mM NaCl, 15 mM KCl, 40 mM MgSO<sub>4</sub>, 4.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose, 50 mM Sucrose, 10 mM Pipes, pH=6.95)或 1X PBS(Phosphate-buffered Saline:137 mM NaCl, 268 mM KCl, 10.14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.2) (Sambrook *et al.*, 1989)，在解剖顯微鏡下方的載物檯上，使用兩付尖頭鑷子，一支夾住蟲體一半處，另一支鑷子夾住口器部位後，往前拉，挑出連著腦的眼碟(eye disc)後，立即將樣本泡入固定液(Fix solution: 4% Paraform- aldehyde、1X PBS)中，靜置以固定樣本，大約 20~30 分鐘。先浸泡在林格氏液當中，以尖鑷將眼碟與 antana disc 相連著的組織以外的多餘部分去除(腦以及細的絲狀物質特別注意要去除乾淨)。

B.) 蛹期的判斷，是挑剛從三齡幼蟲形成的白色蛹，放置於收集盒中，使用沾滿二次水的濕紙巾，蓋住收集盒的二分之一，以維持盒中一定的溼度。放置在 25°C 的恆溫培養箱中，待蛹個別到達 35%、50%、75% 蛹期發育階段的時數。將蛹取出，黏貼於雙面膠膠面穩定，利用尖鑷在不傷害蛹體的情況下，先自蛹蓋(operculum)挑起，除去褐色外殼，將白色蛹體黏貼於雙面膠膠面，滴上林格氏液後，以解剖刀割開頭頂部分一個切口後，擠出頭部的組織，挑出眼睛(pupal retina)，清除多餘的組織，立即將樣本浸泡入固定液當中，靜置 20~30 分鐘，以固定我們要看的組織。先在林格氏液當中浸泡，以尖鑷與接有鎢絲

的針棒，將多餘的組織挑掉。其中 35% 的 pupal retina，若是位在其凹面的腦去不乾淨，至少要將腦組織突出凹面的部分切齊。50% 的 pupal retina 則是要將腦以及其他沾黏於其上的組織去除乾淨，只留下呈半透明、圓弧型，狀似隱形眼鏡的組織構造。75% 的 pupal retina 除了要將兩眼之間的組織與腦的部分去掉之外，覆蓋於 retina 表面的角質層 (conear) 要儘可能地去掉。

由 A.) 與 B.) 取出的組織樣本，接著於室溫下，將樣本泡入滴好在解剖盤上的 PBST (1X PBS, 0.3 % Triton X-100) 當中清洗，一共三次，每次 10 分鐘。取出樣本，置於染色盤中，一個 well 放 5~10 個樣本，加入 10~12  $\mu$ l 的 phalloidin (1:100)，靜置於 4 的冰箱中。隔夜後(約 10~16 個小時)取出，以 PBST 清洗三次，每次 10 分鐘。將樣本加入平時保存在 4°C 冰箱中保存的 Mounting medium(註一)中，再吸到載玻片上，進行樣本的封片。封完片之後，將玻片保存於 -20 的冰箱。封片時要注意的是，三齡幼蟲的眼碟清洗完畢以後，先吸到少量 Mounting medium 中靜置，待樣本略為沉澱之後，吸到載玻片上，直接以蓋玻片與載玻片成 45 度角，輕輕地蓋下。而果蠅蛹期發育到 35%、50%、75% 的樣本封片處理，則在 Mounting medium 當中靜置，待樣本略為沉降以後，分別在三個不同的載玻片上，預先貼上兩道透明膠帶、一道黃

色膠帶、兩道黃色膠帶，將樣本置於載玻片後，於光學解剖顯微鏡底下，將 retina 調整至凸面朝上，然後以蓋玻片與載玻片呈 45 度角，輕輕且緩緩地蓋下，空隙以 Mounting medium 由膠帶內緣補入。均留意盡量不要留有氣泡。其中，所使用的是來自 Sigma 藥品製造商，取自 *Amanita phalloides* 的有毒真菌類中，帶有紅色螢光的 phalloidin。平常 phalloidin 放置在 0°C 以下的冰箱當中保存，要使用時，取出需要使用的量，稀釋後，置冰上備用。該分子具有環狀結構，主要會結合在細胞骨架中的主成分之一---肌動蛋白絲(actin filaments)上，特別是 F-actin 的交界面，功能在使細胞骨架穩固地生成，可藉以觀察整個細胞的形態生成。

### 三、 共軛焦螢光顯微鏡掃描攝影技術

共軛焦螢光顯微鏡的成像原理，是使用雷射光經由掃描器(Scanner mirrors)的引導之下，以點接點(Point by point)依序構成平面的方式，對螢光樣本進行激發(Excitation)與發散(Emission)訊息的擷取。並且將所獲得的螢光訊息，利用調控成像共焦面(Confocal plane)處的一小孔(Pinhole)的大小，阻擋非焦面的螢光雜光進入感測器中，以解決傳統螢光顯微鏡在非焦面雜光的干擾下，所造成的模糊光蔽。進而產生螢

光呈像較為澄清化的光學切片效果影像，而達到提升螢光顯微影像品質的目的。本研究是利用在波長 543nm 的雷射光照射下，使用 LSM 510 軟體及 Zeiss Axiovert 100 的顯微鏡，擷取樣本所帶的紅色螢光被激發以後，所獲得的螢光訊息，進行掃描拍攝不同發育階段，果蠅眼睛的構造圖。

在果蠅成蟲複眼表面的光學攝影方面，我們使用型號為 Carl Zeiss SV II，台灣儀器行製作的光學解剖顯微鏡，上方接有 Canon 數位相機進行拍攝。利用將果蠅成蟲靜置在滴有液態乙醚的 50 ml 尖體離心管中，在避免果蠅眼睛碰到乙醚的前提下，將果蠅迷昏，倒入尖體離心管的蓋子上，將離心管倒置，靜置大約 15~20 分鐘。在玻片上貼有黏性較不強的雙面膠，並且將已經迷昏的果蠅成蟲依序排列在雙面膠上。在光學顯微鏡下，將果蠅眼睛調整到，可以照到最大面積的角度，利用手動調焦距的方式，拍攝固定放大倍率的眼睛。最後，使用 photoshop CS3 軟體(Adobe)排圖並且展示。

註一、先在 10ml 的 10X PBS 中加入 100mg 的 1, 4- phenyl-enediamine。將調配好的溶液加入 90ml 的甘油(glycerol)，混合均勻後，置於玻璃瓶中，避光，放在 4°C 冰箱當中保存。

## 結果

### 一、 果蠅成蟲眼睛表面的觀察

本研究使用過去我們實驗室所製作出來的轉殖基因果蠅(*UAS-Trc* 與 *UAS-Trc KD*)，分別與 *GMR-Gal4* 品系的果蠅交配後，將可以表現出把 Trc 完整地表達出來的蛋白，以及在 Ser288 與 Thr449 兩個活化位點均取代成持續無法被磷酸化的 alanine 胺基酸---Trc kinase dead 的蛋白 (簡稱為 Trc KD)，兩者均分別大量地被表現在果蠅眼睛的組織當中。從成蟲的數位光學顯微攝影結果，我們觀察到野生種的果蠅(本研究統一使用 *GMR>GFP* 品系的果蠅作為控制組) 複眼呈現上寬下窄，接近圓形的形態。在複眼表面的外觀呈現橘紅色，具有許多呈規則排列，並代表著每一個小眼所在位置的淺色小點(圖 1. A)。然而，在果蠅眼睛大量表達 Trc KD 的實驗組，其複眼外觀上，除了呈現較為橘黃色之外，複眼的表面出現部分區域的小眼，呈現較不光滑，小眼排列較不規則的表現形態 (Rough eye) (圖 1. C)。另外，在果蠅眼睛大量表達完整 Trc 蛋白的實驗組，在果蠅成蟲的眼睛表面，外觀上與控制組相似，都是呈現較為平滑，並且具有淺色小點亮澤的形態(圖 1. B)。由這樣的觀察結果，我們推測，當 Trc 蛋白的活性正常，對果蠅眼睛構

造上的形態發生過程，可能具有一定的重要性。因此，我們進一步地去探討，果蠅眼睛在早期的發育過程當中，Trc 蛋白大約是從什麼階段開始，就具有顯著的調控功能?如果有，那麼 Trc 活性的正常與否，對眼睛構造的形態生成上，在不同的發育階段中，分別會具有什麼樣的影響?

## 二、 果蠅三齡蟲期眼碟的細胞構造形態之觀察

本研究使用 phalloidin 的螢光染色技術，藉由染出細胞骨架的主要成分之一-- F-actin 的分布位置，去觀察眼睛細胞的整體形態構造。我們將所有的螢光染色結果，利用共軛焦螢光顯微鏡的掃描攝影技術，將所拍攝到的圖，都利用軟體轉換成色彩對比較高的黑白色系，企圖觀察到較細部的細胞構造。我們先從果蠅三齡蟲期的眼碟，剛形成「形態生成溝」的時期，特別是針對生成溝的後方，已經具有分化能力的細胞形態構造進行觀察。染色的結果顯示，*GMR>GFP* 的果蠅，代表正常的果蠅眼睛在發育的過程中，進入三齡蟲期之後的眼碟，在形態生成溝的後方，陳列著具有分化能力的感光細胞，是呈現細胞間的排列整齊，並且細胞的形態構造，是較為規則的四邊形(圖 2. A)。實驗的結果顯示，無論是在眼睛大量表現 Trc 蛋白(*GMR>Trc*)或是 Trc

KD(*GMR>Trc KD*)的實驗組，其三齡蟲期眼碟的”形態生成溝”後方，細胞的構造都是呈現排列規則，且呈四邊形的形狀，細胞彼此之間緊密地排列(圖 2. B, C)。另外，在形態生成溝的後方鄰近處，幾個細胞之間，有隨機存在的細胞間隙。而這一點在野生種三齡蟲期的眼碟當中，也是屬於常見的正常表現形態。總和以上的細胞形態觀察結果，與控制組的染色結果相比，均沒有明顯的差異。

### 三、 於果蠅蛹期不同發育階段的眼晴形態構造之觀察

在發育成蛹之後，由控制組(*GMR>GFP*)的果蠅於 35% 蛹期發育階段的眼晴組織當中，已經可以看到初步的感光細胞生成，形成環狀排列。感光細胞的頂面朝內，位在頂面的感光構造已逐漸分化形成。由 phalloidin 染色的結果顯示，控制組 (*GMR>GFP*) 的果蠅進入 35% 的蛹期發育階段，每個小眼所屬的細胞構造上，均成為單一六邊形的整齊構造，相鄰排列(圖 3. A)。在果蠅眼睛中大量表達 *Trc KD* 的實驗組(*GMR>Trc KD*)，感光細胞的構造呈現形狀大小差異較大，細胞之間的排列，是較為鬆散的形態(圖 3. C)。在果蠅眼睛大量表達完整 *Trc* 蛋白的實驗組(*GMR>Trc*)，則在小眼的結構形態上，呈現單一六邊形的整齊構造，彼此相鄰排列。感光細胞的形狀大小差異不大，與野生種

的控制組(*GMR>GFP*)沒有明顯的差異(圖 3. A, B)。

在 50%的蛹期，果蠅眼睛的發育，在此階段經歷「計畫性細胞死亡」(programmed-cell-death)的過程，幫助眼睛的組成細胞，得以分化成熟。造成錐體細胞的外圍細胞層，主要是由色素細胞與剛毛細胞所構成的細胞，逐漸分化成單層。本研究在 50%蛹期的發育階段的螢光染色結果，分別拍攝(apical, middle, and basal)三個不同共軛焦平面的螢光染色圖，代表由淺到深，三種不同深度的眼睛細胞構造染色的結果。以 *GMR>GFP* 的果蠅作為控制組(圖 4. A, A' and A'')，由眼睛組織的螢光染色結果顯示，在發育到 50% 蛹期的果蠅眼睛，在控制組(*GMR>GFP*)當中，由眼睛整體頂面(apical)的共軛焦平面所掃描到的圖，呈現規則的六邊形，中間以視神經為中央，外面有 4 個錐體細胞緊密相鄰。而錐體細胞外有一對初級色素細胞，更外圍有已分化成為單層的其餘色素細胞與剛毛細胞(圖 4. A)。在正常的果蠅眼睛細胞當中，中間層的染色結果顯示，以形狀大小差異不大的感光細胞，呈環狀排列，細胞頂面朝小眼所在位置的中央。在感光細胞的外圍，是其餘的色素細胞與剛毛細胞，已經成功地分化成單層的細胞層。六邊形角落的圓形小亮點，代表的是剛毛細胞的所在位置(圖 4 A')。控制組(*GMR>GFP*)果蠅眼睛的最深一層螢光染色結果，會有 6 個由中央向外呈現放射狀或

是花瓣狀的二級色素細胞。在兩個二級細胞的間隔當中，存在著有呈現三角形的三級色素細胞，以及呈現橢圓狀的剛毛細胞。三級色素細胞與剛毛細胞，各自總數均有 3 個 (圖 4. A'')。然而在果蠅眼睛大量表現 Trc KD 的實驗組(*GMR>Trc KD*)，從眼睛本體較為頂面的共軛焦平面，所得的螢光染色結果，顯示錐體細胞的形狀大小差異比較大，細胞所分佈的位置與細胞構造的形態均不規則，細胞的排列也較為紊亂。在錐體細胞的外層，無法呈現代表已成功地分化完成的單層細胞層(圖 4. C)。在 *GMR>Trc KD* 實驗組的果蠅眼睛本體，接近中間層的共軛焦平面，所獲得的螢光染色結果，呈現感光細胞的形狀不規則，構造較為扭曲，排列上仍是呈環狀排列，細胞的頂面朝小眼中央，但是環狀構形具有呈現扭曲的不規則狀態。在感光細胞外圍的細胞層，細胞的大小型態差異比較大，無法成功地被分化為單層。並且在外圍細胞層的邊緣有疑似剛毛細胞的構造，呈現較野生種剛毛細胞的染色結果大的同心圓構造(圖 4 C')。並且在 *GMR>Trc KD* 實驗組最深一層的共軛焦平面的染色結果，呈現二級、三級色素細胞以及許多細胞的形態尚未被分化完全，也無法清楚區分出不同類別的細胞所屬區域。在細胞整體的形狀以及細胞之間的排列上，也較為不整齊(圖 4 C'')。在表現完整 Trc 蛋白的實驗組(*GMR>Trc*)當中，則與控制組(*GMR>GFP*)的染色結果，分別在不同層的共軛焦平面掃描結果、整體細胞結構上

以及細胞之間的排列上，整體眼睛本體，在構造上的表現形，並沒有明顯的差別(圖 4. B, B' and B'')。

發育到 75%的蛹期階段，此時主要由細胞骨架為主要成分所組成的微絨毛(Microvilli)，構成的感光構造--桿小體(rhabdomere)會在感光細胞的頂面，藉由微絨毛的逐漸堆積、增厚，而形成卵圓形。本研究的螢光染色結果，在同一個共軛焦平面上，看到一共有 7 個桿小體。其中，R1-R6 呈梯形並依序排列，R7 位在中央。在野生種果蠅(*GMR>GFP*)眼睛的染色結果，於 75%蛹期時，桿小體呈現卵圓形的構造，排列依序呈現梯型的分佈，R7 位在中央的位置。桿小體彼此之間有一定的明顯間距已經生成，稱做"interrhabdomere-space" (IRS) (圖 5. A)。而在果蠅眼睛大量表達 Trc KD 的實驗組(*GMR> Trc KD*)，於 75%蛹期時的螢光染色結果顯示，桿小體並沒有成功地形成卵圓形，而是呈現彎曲長條狀，或是破裂以及局部桿小體分裂的形態。此外，桿小體在排列上，也出現較紊亂、糾結在一起的表現型(圖 5. C'')。而在果蠅眼睛大量表現完整 Trc 蛋白的實驗組(*GMR>Trc*)，於 75%蛹期的發育階段，桿小體並沒有形成卵圓形，而是呈現較為細長且彎曲的桿狀，由觀察的結果發現，似乎略有發育階段較為延遲的表現型。但是桿小體的排列，大致上與控制組沒有明顯的差別(圖 5. B)。

## 討論

### 一、 Tricornered(Trc)蛋白在果蠅眼睛形態發生的調控角色

在果蠅的眼睛組織，大量地表達 Trc KD 的實驗組當中，我們發現當 Trc 的磷酸化活性無法被正常表達時，會造成眼睛結構在形態發育過程上的損壞。總和前人研究的結果，我們推測，在果蠅體內，Hippo 會磷酸化 Trc 並且藉此活化 Trc，使 Trc 具有可以磷酸化下游分子的功能(Emoto *et al.*, 2006)。而果蠅體內的 Mob2 蛋白與 Trc 有直接鏈結的關係(He *et al.*, 2005)。Mob 蛋白會成為 Trc 的共同活化子(coactivator)，促進 Trc 的磷酸化，並且活化下游分子。進而對上皮細胞的極性生成，以及神經細胞的樹突正常生長具有調控的功能(Hergovich *et al.*, 2008)。我們的研究是藉由 phalloidin 的螢光染色，觀察細胞骨架的主要成分之一——肌動蛋白(actin)的分布位置，以觀察果蠅眼睛細胞的結構。我們的研究結果顯示，當 Trc KD 蛋白的兩個位點，均取代成 alanine，即會呈現 Trc 持續沒有活性的狀態，做為表現 Dominant negative 的對偶基因所表現出的蛋白質。若 Trc 蛋白沒有辦法被磷酸化，就不會具有行使磷酸化下游分子的活性。進而影響到細胞極性生成的不正常，眼睛構造的形狀不規則，以及桿小體的排列順序紊亂與形狀無法形成卵圓形。由前人的研究當中，藉由使用抑制肌動蛋白

(actin) 增殖的藥物，所造成的毛髮表現形態，近似於當 Trc 蛋白失去活性的果蠅上皮細胞毛髮構造的表現形態。由此研究結果推論，Trc 的作用目標是藉由影響肌動蛋白(actin)的功能，進而調控果蠅上皮細胞的形態生成(Geng *et al.*, 2000)。結合前人與我們的研究結果，我們推測 Trc 蛋白活性的正常，會藉由影響肌動蛋白的正常增殖(proliferation)，影響到發育過程中，細胞骨架的正常生成，進而影響果蠅的眼睛在外觀上的形態，以及組成的細胞構造成功發育。在果蠅眼睛的感光構造--桿小體，主要是由微絨毛(microvilli)所構成。而微絨毛，是由許多肌動蛋白(actin)為主要的構成成分。在眼睛的發育過程中，桿小體會藉由微絨毛逐漸地累積，而形成卵圓形。當在果蠅眼睛大量表達 Trc KD，於 75% 蛹期的桿小體，由本研究所使用的 phalloidin 螢光染色結果顯示，桿小體具有分裂及排列上，呈現不規則的現象。我們推測，可能是當 Trc 蛋白的活性沒有辦法被活化，而不具有活化下游分子的活性時，會引起微絨毛的堆積過程發生錯誤，有可能是早期的發育過程中，肌動蛋白的不正常增殖，影響感光細胞的形態生成不規則，進而造成桿小體的分裂與排列不規則的表現形態。

## 二、 Trc 與 Dmob2 對果蠅眼睛形態生成上的調控功能

在果蠅體內有 4 個 Mob(Mps-one-binder) 蛋白，在遺傳上分別均與 Trc 為結合具有結合關係的夥伴蛋白(He *et al.*, 2005)。但是，實際上前人研究，目前尚只證實 Dmob2 與 Trc 有直接鍵結的關係 (He *et al.*, 2005)。在我們實驗室過去的研究結果當中，利用 *GMR-Gal4* 品系的果蠅做為 Driver，與具有 Dmob2 的 RNA 干擾(RNA interference, RNAi) 的轉殖基因果蠅，將兩種品系的果蠅交配之後，所產下的第一子代，即會在眼睛的部位，大量表現 Dmob2 RNAi，以達到降低眼睛部位的 Dmob2 蛋白質表達的目的。結果顯示，在果蠅蛹期的眼睛發育階段，當 Dmob2 降低表達時，造成 35% 蛹期眼睛的感光細胞，細胞大小差異大，以及組成細胞形狀上的不規則。50% 蛹期眼睛的二級、三級色素細胞與剛毛細胞都沒有辦法成功地分化成單層。在 75% 的蛹期眼睛，當降低 Dmob2 蛋白的表現量時，則會出現桿小體的形狀異常，無法成功的呈現卵圓形，而是形成較為細長，並且各個桿小體之間擠成一團，排列上也呈現較不規則的形態(數據沒有顯示)。顯示當在果蠅眼睛部位的 Dmob2 蛋白表現量被降低時，對眼睛構造上所造成的損壞表現形態，近似於本研究結果，Trc KD 在果蠅眼睛大量表達的實驗組，所顯示的眼睛細胞組成損壞的表現形態。由 Dmob2 蛋白的研究結果推測，Dmob2 的正常表現可能會藉由影響下游的未知調控分子，並進而

影響最終的眼睛細胞，以及眼睛整體結構上的正常發育。

總和前人的研究結果、本實驗室前人與本研究的實驗結果，我們推測，當 Dmob2 降低表達，會導致 Dmob2 降低與 Trc 的結合率，造成下游的調控分子被活化的量減少，影響細胞骨架的增生不正常，眼睛的構造生成異常。而 Trc KD 使 Trc 蛋白持續無法被磷酸化，因而無法具有調控下游分子的能力，進而造成眼睛組成的細胞構造上的缺陷。因此我們推測，Trc 與 Dmob2 是作用在同一個作用途徑上，並且同樣對果蠅眼睛發育過程中，形態生成上，可能具有不可或缺的調控角色。

但是，我們目前的研究結果並無法確切地證實，Trc 蛋白具體上在果蠅眼睛的發育過程所扮演的調控角色。未來我們實驗室後續有人，可以進一步地針對下列幾方面的研究，進行對 Trc 蛋白的調控功能上，作更深入的探討與證明。為了再度證實 Trc 蛋白對果蠅眼睛形態生成上的重要性。未來我們實驗室後續會有人，使用令 *trc* 基因完全失去活性(*trc* null mutant)的突變果蠅，以及具有 *trc*-RNA 干擾的轉殖基因果蠅，利用 *GMR-Gal4* 作為 Driver，在果蠅的眼睛當中，去觀察當完全失去 *trc* 基因編碼的蛋白質活性，或者當 *trc* 基因被降低表達之後，對

果蠅眼睛構造上，以及內部組成細胞的形態生成上，有何種損壞的表現形態？目的在更進一步地證實，即便在相關的調控作用途徑仍不清楚的情況下，Trc 對於調控果蠅眼睛細胞的形態發育上，具有重要的功能。

由前人的研究結果顯示，在 PC 12 細胞的培養當中，發現 Ndr2 蛋白與肌動蛋白(actin)有分布位置重疊的現象，顯示該蛋白可能在神經細胞的形態生成具有調控的功能(Stork *et al.*, 2004)。使用對抗 Trc 蛋白的抗體去作免疫螢光染色，觀察在野生種果蠅當中，在正常的情况下，Trc 蛋白在不同發育階段的果蠅眼睛細胞，觀測 Trc 所分布的次細胞(subcellular)位置。如此可以探討，Trc 在眼睛細胞當中的作用位置，以及是否會因為發育階段的不同，而有變換分布位置的情形？進而可以推斷出 Trc 在眼睛細胞中，相關的調控與被調控位置。

由前人的研究結果得知，大約在發育到 50% 蛹期時，在果蠅的眼睛組成細胞當中，錐體細胞外圍的色素細胞與剛毛細胞，會發生計畫性細胞死亡，隨著分化過程的逐漸成熟而成為單層(Monserrate and Brachmann, 2007)。本研究結果當中，在眼睛大量表達 Trc KD 時，由發育到 50% 的蛹期 phalloidin 螢光染色結果當中，我們發現錐體細胞外圍的其餘色素細胞與剛毛細胞，並沒有如控制組一般，成功地分化成

單層(圖 4 C, C')。推測當 Trc 蛋白呈持續無法被磷酸化的狀態，會影響果蠅眼睛在生成過程中的「計畫性細胞死亡」(programmed-cell-death)。為了更進一步地證實此研究結果，未來我們實驗室後續有人，會使用偵測死亡細胞數的染劑作為標示物(cell death marker)，針對 Trc KD 大量表達後的實驗組，所造成的死亡細胞數，與正常的野生種果蠅，在相同發育階段的死亡細胞數，兩相比較之後，計算出細胞死亡率百分比的差異。探討 Trc 蛋白的正常活性，是否具有調控果蠅眼睛組成細胞分化過程當中，在所經歷的「計畫性細胞死亡」(programmed-cell-death)當中，有所影響？如此可以更進一步地推測，Trc 蛋白在果蠅眼睛的形態生成上，所具有的調控角色。

## 參考文獻

Bichsel, S. J., Tamaskovic, R., Stegert, M. R., and Hemmings, B. A. (2004). Mechanism of activation of NDR (Nuclear Dbf2-related) protein kinase by the hMOB1 protein. *J. Biol. Chem.* Vol. 279, No. 34, pp. 35228–35235.

Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401- 415.

Devroe, E., Bromage, H. E., Tempst, P., and Silver, P. A. (2004). Human Mob proteins regulate the NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases. *J. Biol. Chem.* Vol. 279, No. 23, pp. 24444–24451.

Eaton, S., (1997). Planar polarization of *Drosophila* and vertebrate epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 860-866.

Emoto, K., He, Y., Ye, B., Grueber, W. B., Adler, P. N., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2004). Control of dendritic branching and tiling by the

Tricornered-kinase/ Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons. *Cell* Vol. 119, 245–256.

Emoto, K., Parrish, J. Z., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2006). The tumour suppressor Hippo acts with the NDR kinases in dendritic tiling and maintenance. *Nature* Vol. 443, 210-213.

Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell*, 87, 651–660.

Freeman, M. (1997). Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Dev.* 124, 261-270.

Geng, W., He, B., Wang, M. and Adler, P. N. (2000). The *tricornered* gene, which is required for the integrity of epidermal cell extensions, encodes the *Drosophila* Nuclear DBF2-related kinase. *Genetics* 156: 1817–1828.

Hayashi, T. and Carthew, R. W. (2004). Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature*, 43: 647-652.

Hays R., Wickline L., and Cagan R. (2002) Morgue mediates apoptosis in the *Drosophila melanogaster* retina by promoting degradation of DIAP1.

*Nat. Cel. Bio.* 4:425-431.

Hergovich, A., Bichsel, S. J., and B. A. Hemmings. (2005). Human NDR kinases are rapidly activated by MOB proteins through recruitment to the plasma membrane and phosphorylation. *Mol, and Cell. Biol.*, p. 8259–8272.

Hergovich, A., Cornils, H., Hemmings, B. A. (2008). Mammalian NDR protein kinases: from regulation to a role in centrosome duplication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784, 3-15.

Hergovich, A., Stegert, M. R., Schmitz, D. and Hemmings, B. (2006). NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Mol. Cell Biol.* 7:253-264.

He, Y., Emoto, K., Fang, X., Ren, N., Tian, X., Jan, Y. N. and Adler, P. N. (2005). *Drosophila* Mob family proteins interact with the related Tricornered (Trc) and Warts (Wts) kinases. *Mol. Biol. Cell* Vol. 16: 4139–4152.

He, Y., Fang, X., Emoto, K., Jan, Y. N., and Adler, P. N. (2005). The Tricornered Ser/Thr protein kinase is regulated by phosphorylation and

interacts with Furry during *Drosophila* wing hair development. *Mol. Biol. Cell* Vol. 16, 689–700.

Hsiung, F. and Moses, K. (2002). Retinal development in *Drosophila*: specifying the first neuron. *Hum. Mol. Gen.*, Vol. 11, No. 10: 1207–1214.

Kim, M., Lee, J. H., Koh, H., Lee, S. Y., Jang, C., Chung, C. J., Sung J. H., Blenis J. and Chung J., (2006) Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development. *EMBO* 25, 3056–3067.

Loewer, A., Soba, P., Beyreuther, K., Paro, R., and Merdes, G., (2004). Cell- type-specific processing of the amyloid precursor protein by Presenilin during *Drosophila* development. *EMBO Rep.* 5(4): 405–411.

Longley, R. L., Jr., and Ready, D. F. (1995). Integrins and the development of three-dimensional structure in the *Drosophila* compound eye. *Dev. Biol.* 171, 415-433.

Mah, A. S., Jang, J. and Deshaies, R. J. (2001). Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 7325–7330.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.

Millward, T., Cron, P., and Hemmings, B. A. (1995). Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine (threonine) protein kinase. *Biochemistry*, 92: 5022-5026.

Millward, T. A., Hess, D. and Hemmings, B. A. (1999). Ndr protein kinase is regulated by phosphorylation on two conserved sequence motifs. *J. Biol. Chem.* 274: 33847–33850.

Mirkovic, I., and Mlodzik, M. (2006). Cooperative activities of *Drosophila* DE-Cadherin and DN Cadherin regulate the cell motility process of ommatidial rotation. *Dev.* 133, 3283-3293.

Monserrate, J. P. and Brachmann, C. B. (2007). Identification of the death zone: a spatially restricted region for programmed cell death that sculpts the fly eye. *Cell Death and Differentiation*, 14, 209–217.

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

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Stegert, M. R., Tamaskovic, R., Bichsel, S. J., Hergovich, A., and Hemmings, B. A. (2004). Regulation of NDR2 protein kinase by multisite phosphorylation and the S100B calcium-binding protein. *Biol. Chem.* Vol. 279, No. 22: 23806–23812.

Stork, O., Zhdanov, A., Kudersky, A., Yoshikawa, T., Obatam, K., and Pape, H. C. (2004). Neuronal functions of the novel serine/threonine kinase Ndr2. *J. Biol. Chem.* Vol. 279, No. 44: 45773–45781.

Tamaskovic, R., Bichsel, S. J., Rogniaux, H., Stegert, M. R., and Hemmings, B. A. (2003). Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-mediated regulation of NDR protein kinase through autophosphorylation and phosphorylation by an upstream kinase. *J. Biol. Chem.* Vol. 278, No. 9: 6710–6718.

Turner, C. M. and Adler P. N. (1998). Distinct roles for the actin and microtubule cytoskeletons in the morphogenesis of epidermal hairs during wing development in *Drosophila*. *Mech. Dev.* Jan; 70(1-2):181-92.

Verde, F., Wiley, D. J. and Nurse, P. (1999). Fission yeast *orb6*, a ser/thr protein kinase related to mammalian rho kinase and myotonic dystrophy kinase, is required for maintenance of cell polarity and coordinates cell morphogenesis with the cell cycle. *Genetics*. Vol. 95, pp. 7526–7531.

Weiss, E. L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D. G. and Luca, F. C. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p–Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell– specific localization of Ace2p transcription factor. *J. Cell. Biol.* Volume 158, Number 5, 885-900.

Wolff, T. and Ready, D. F., (1991). Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Dev.* 113, 825-839.

Wong, L. L., and Adler, P. N. (1993). Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J. Cell Biol.* 123: 209-221.

Yarden, O., Plamann, M., Ebbole, D. J. and Yanofsky, C. (1992). *cot-1*, a gene required for hyphal elongation in *Neurospora crassa*, encodes a protein kinase. *EMBO J.* 11 (6):2159-66.

Zallen, J. A., Peckol, E. L., Tobin, D. M. and Bargmann, C. I. (2000).

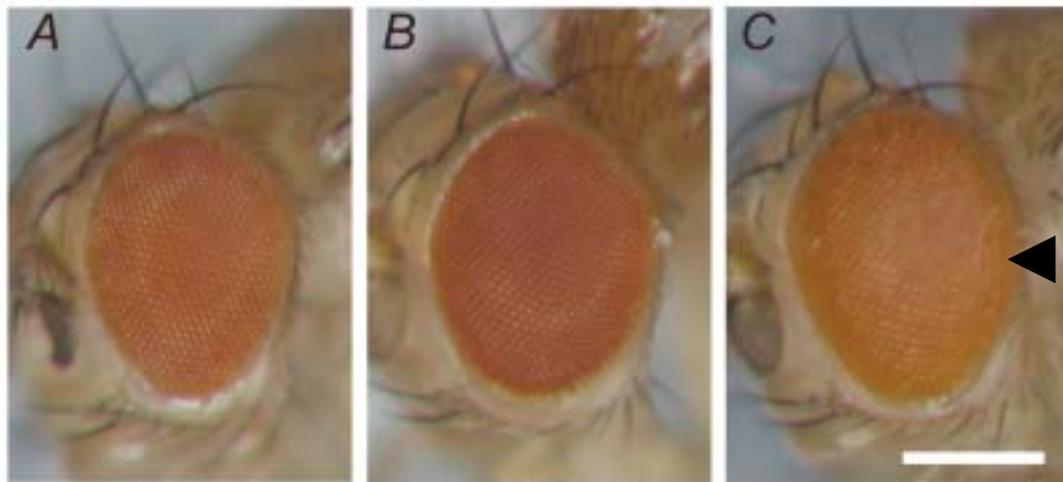
Neuronal cell shape and neurite initiation are regulated by the Ndr kinase

SAX-1, a member of the Orb6/COT-1/Warts serine/threonine kinase

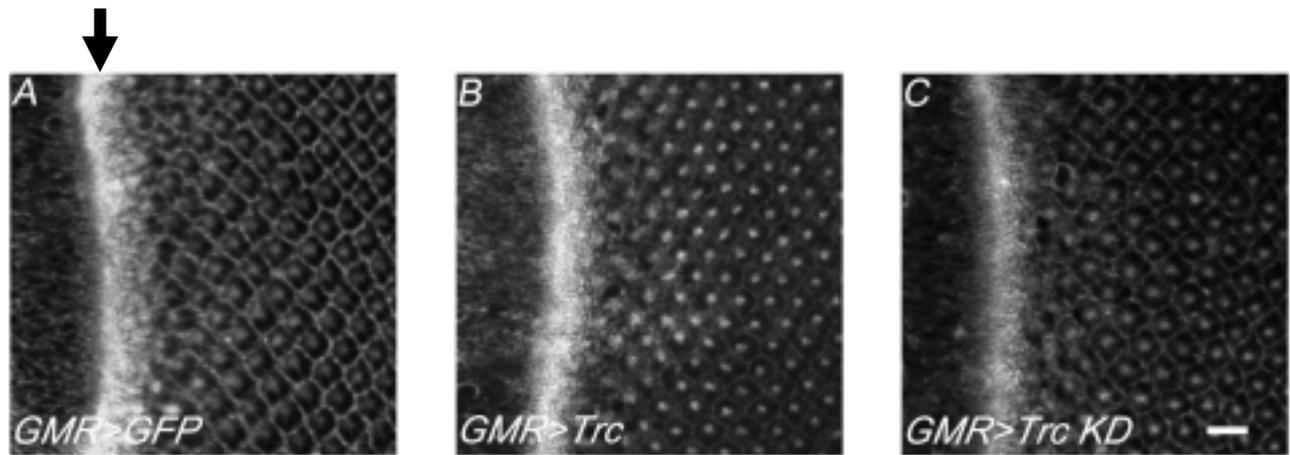
family. *Mol. Biol. Cell* Vol. 11, 3177–3190.

## 圖目

圖一、果蠅成蟲眼睛外觀的光學顯微照片 .....	47
圖二、果蠅三齡蟲期眼碟中，細胞結構的共軛焦螢光顯微鏡攝影圖 .....	48
圖三、果蠅 35% 蛹期眼睛細胞結構的共軛焦螢光顯微攝影圖..... .....	49
圖四、果蠅 50% 蛹期眼睛的共軛焦螢光染色圖 .....	50
圖五、果蠅 75% 蛹期桿小體構造的共軛焦顯微螢光染色圖 .....	52
附圖一、果蠅體內調控型態生成的 Trc/Hpo 蛋白相關調控路徑...	53

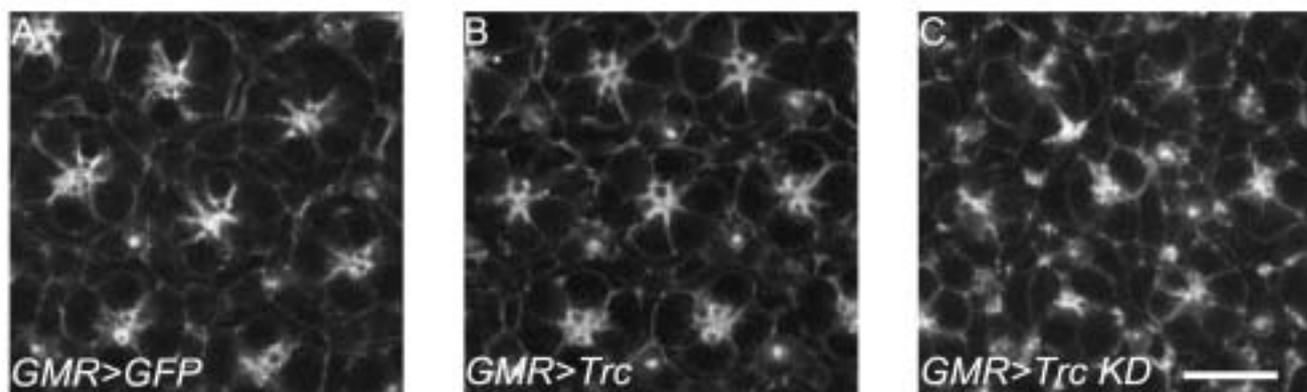


圖一、果蠅成蟲眼睛外觀的光學顯微照片。(A) 擷取剛羽化成蟲的 *GMR>GFP* 果蠅作為控制組。正常果蠅眼睛表面呈現光滑，具有代表每個小眼的淺色小點，整齊排列。(B) *GMR>Trc* 成蟲眼睛表面，外觀相近於正常果蠅。(C) *GMR>Trc KD* 的果蠅成蟲眼睛表面，出現較不光滑、淺色小點不明顯，小眼排列成不規則的(Rough eye)表現型(如黑色箭頭所指)。游標尺= 500  $\mu\text{m}$ 。

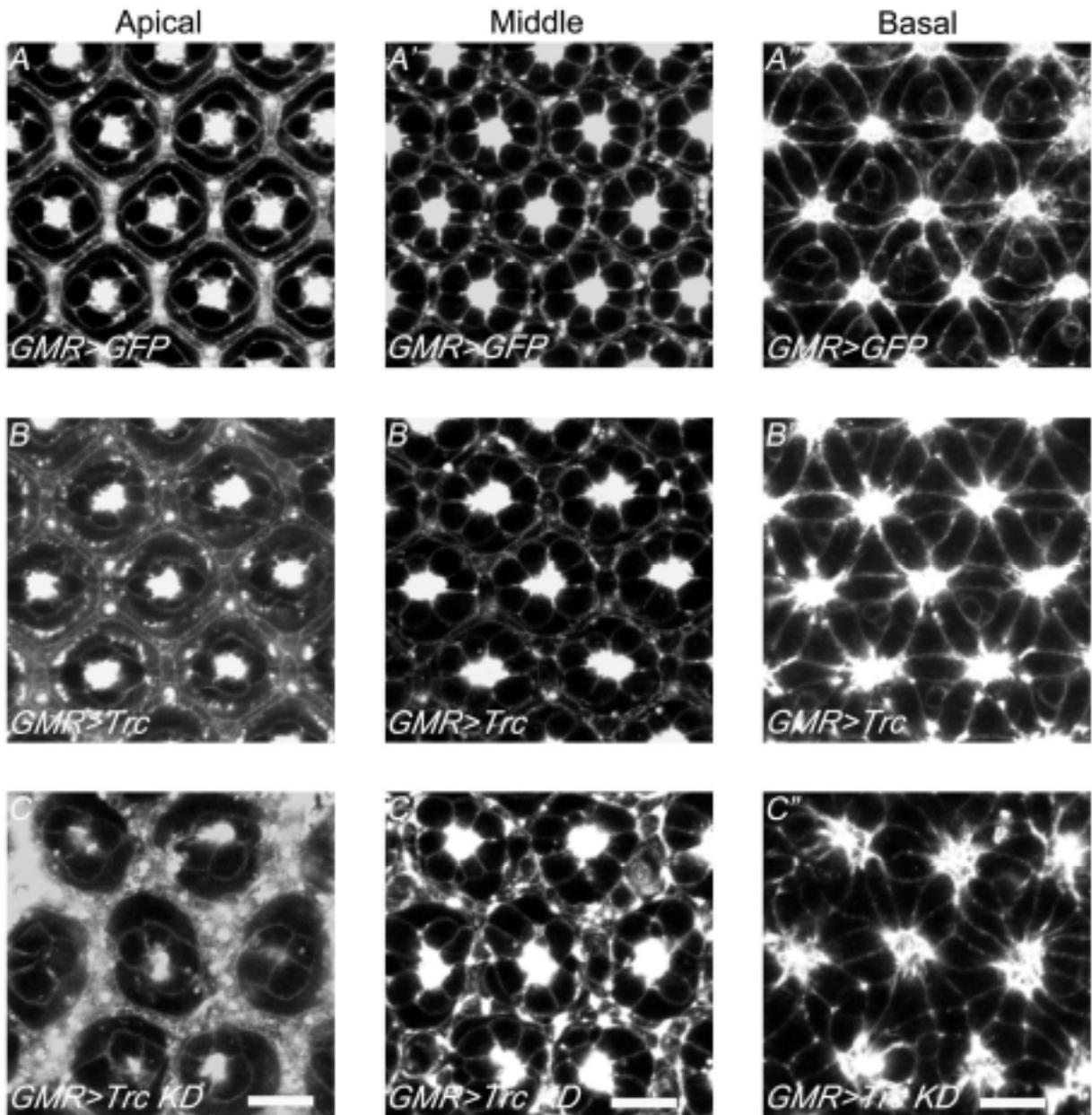


圖二、果蠅三齡蟲期眼碟中，細胞結構的共軛焦螢光顯微鏡攝影圖。

(A)於三齡蟲期，白色縱向的構造稱為”形態生成溝”(Morphogenetic Furrow, MF)(如黑色箭頭所指)。箭頭的右方，代表的是眼碟整體的後方(posterior)，圖片上方為眼碟的背面(dorsal)。*GMR>GFP*的果蠅作為控制組，生成溝後方的細胞呈現排列緊密，形狀規則且完整的狀態。(B) *GMR>Trc*的果蠅三齡蟲期眼碟，生成溝的後方，緊鄰的細胞排列有隨機出現數個細胞間隙的部分，其餘細胞均是緊密相連，規則排列，細胞形狀完整的狀態，近似控制組的細胞型態。(C) *GMR>Trc KD*果蠅的三齡蟲期眼碟，生成溝後方細胞型態與排列，整齊規則與(A)、(B)相近。游標尺=10  $\mu\text{m}$ 。

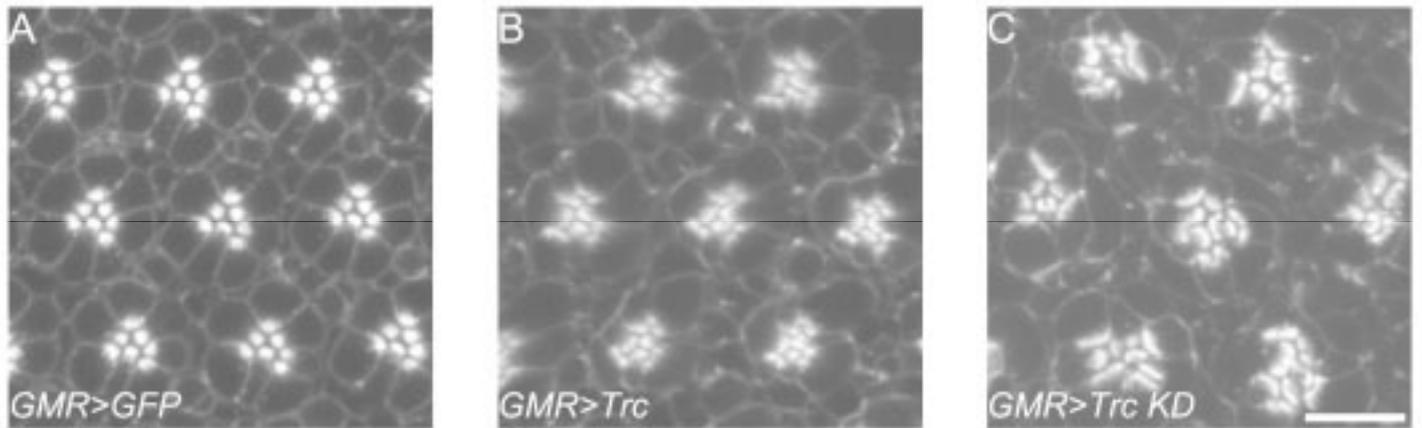


圖三、果蠅 35% 蛹期眼睛細胞結構的共軛焦螢光顯微攝影圖。(A) *GMR>GFP* 果蠅蛹期的眼睛，一個規則六角形代表一個小眼的組成。於 35% 蛹期，眼睛組織已分化出感光細胞，呈頂面朝內地排列成環狀，感光細胞外圍有形狀較不緊密的細胞層。(B) *GMR>Trc*，於 35% 蛹期，感光細胞已形成，細胞大小相近，呈現頂面(apical)朝內面的細胞規則排列，外圍較鬆散的細胞層，為未來會分化成色素細胞與剛毛細胞所組成。(C) *GMR> Trc KD* 的果蠅，於 35% 蛹期，感光細胞的排列較不規則。感光細胞頂面集中處偏離中央，細胞形狀大小不一，排列不規則。細胞數有的小眼呈現較少的感光細胞。小眼之間的細胞層距離較(A)的果蠅細胞結構鬆散。游標尺= 10  $\mu\text{m}$ 。



圖四、果蠅 50% 蛹期眼睛的共軛焦螢光染色圖。(A)、(A')與(A'')是表現 GFP 的對照組果蠅 ( $GMR>GFP$ )，於 50% 蛹期眼睛，不同共軛焦平面(focal plane)的掃描結果。(A)  $GMR>GFP$  於 50% 蛹期，眼睛呈現規則的六邊形，有 4 個錐狀細胞位在中央，外圍有一對彎月狀的初級色素細胞，最外圍有 6 個二級色素細胞，3 個三級細胞，3 個剛

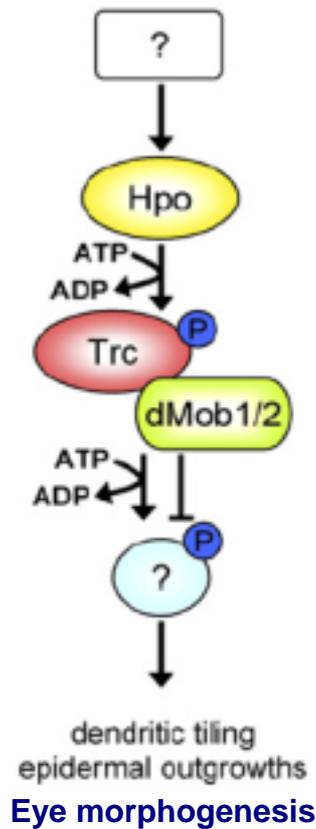
毛細胞位在六邊形的邊角，以隔一個轉角的規律分佈。(A') *GMR>GFP* 於 50% 蛹期，每一個小眼的感光細胞呈現大小差異不大，頂面朝內的形態。小眼之間的細胞層，已分化為單層，細胞層的寬度變窄。(A'') 6 個二級色素細胞以視神經的中心，向外呈輻射長條狀，間隔的三角狀為 3 個三級色素細胞，圓圈構造為剛毛細胞。細胞排列規則，容易區分不同的細胞類別。(B)、(B') 與 (B'') 為 *GMR>Trc* 轉植基因果蠅，於 50% 蛹期的眼睛，不同共軛焦平面的掃描結果。呈現細胞形狀大小，細胞間的排列，分別近似 *GMR>GFP* 的形態。(C)、(C') 與 (C'') 為 *GMR>Trc KD* 的轉植基因果蠅。(C) 於 50% 蛹期眼睛，錐狀細胞大小差異大，成對的初級色素細胞大小不對稱。(C') 感光細胞形狀大小差別明顯，細胞頂面偏離小眼中央，外圍細胞層結構鬆散，細胞並未分化為單層。(C'') 色素細胞構造並未明顯被分化完全，細胞形狀結構較紊亂，無法明顯分辨細胞類別，以及不同細胞類別的總數。游標尺=10  $\mu\text{m}$ 。



圖五、果蠅 75% 蛹期桿小體構造的共軛焦顯微螢光染色圖。(A)

*GMR>GFP* 的轉殖基因果蠅，作為控制組，果蠅眼睛的感光構造，稱做桿小體 (rhabdomere)，於 75% 蛹期已形成卵圓狀，並依序呈梯形分布，整齊排列。桿小體間的空隙(inter-rhabdomere space, IRS)已明顯形成。(B) *GMR>Trc* 的 75% 蛹期果蠅眼睛，桿小體排列順序正常，但部分桿小體尚未完全形成卵圓形。桿小體間的空隙較控制組窄小。(C) *GMR>Trc KD*，於 75% 蛹期的果蠅眼睛當中，桿小體的形狀大部分均呈現細長且較薄，或者是呈破裂的狀態，IRS 較(A)圖窄小。桿小體的排列分布形態，大部份呈現較為紊亂、不呈梯形的規則排列。

游標尺=10 $\mu$ m。



附圖一、果蠅體內調控型態生成的 Trc/Hpo 蛋白調控路徑模式。

Hippo(Hpo;黃色方塊)蛋白，會去磷酸化Tricornered(Trc;紅色橢圓形色塊)蛋白，並且使Trc被活化而具有活性。而被活化的Trc/dMob1與Trc/dMob2複合物(綠色方塊)，參與調控神經細胞樹突的貼覆作用，上皮細胞的生出物，以及為發育過程中，眼睛部位的細胞組成正常發育所必須的分子複合物。(Modified from Hergovich *et al.*, 2008)

## 個人資料

姓名：張育菁

籍貫：台灣高雄縣

出生日期：1984 年 4 月 2 日

戶籍地址：高雄縣彌陀鄉彌靖村美和街 27 號

學歷： 1999-2002 國立新莊高級中學

2002-2006 私立東海大學生命科學系

2007-2009 私立東海大學生命科學系碩士班生物醫學組

經歷： 普通生物學實驗助教

生物多樣性實驗助教