

國立臺灣大學醫學院生理學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Physiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

*infertile crescent (ifc)* 調控胞外體分泌以維持神經功能  
之研究

Investigating the role of *infertile crescent (ifc)* in  
regulating exosome secretion for neuronal maintenance

張之綱

Jhieh-Gang Jhang

指導教授：詹智強博士

Advisor: Chih-Chiang Chan, Ph.D.

中華民國 108 年 2 月

February 2019

## 中文摘要



Infertile crescent (Ifc)具有酵素催化之功能，在果蠅的神經脂質(sphingolipid)從頭合成路徑(*de novo* pathway)中負責將二羥基神經醯胺(dihydroceramide)催化成神經醯胺(ceramide)。先前實驗室利用作用於眼睛的翻轉酶(*eyeless*-flippase, *eyFLP*)在果蠅眼睛產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞(*ifc*-KO/*ifc*-KO)，發現果蠅眼睛失去 *ifc* 會出現光依賴性(light-dependent)神經退化。我們進一步利用 *ey3.5*-FLP 和 *repo*-FLP 分別只在視神經和神經膠細胞失去 *ifc*，發現兩者皆會在視神經電位紀錄(electroretinogram)中出現神經功能退化，但只有在視神經細胞失去 *ifc* 才會看到其形態有明顯退化。在果蠅眼睛失去 *ifc* 的情況下，利用 *repo-ifc*-mCherry 在神經膠細胞中表現 *ifc*-mCherry 可以減緩光依賴性神經退化，從此結果可知神經膠細胞中的 Ifc 可能參與部分神經功能維持。另外，我們將 Ifc 上可能負責酵素催化功能之胺基酸序列突變，過表達(overexpress)此突變的 *ifc*( $\Delta$ C3)-mCherry 則無法減緩果蠅眼睛失去 *ifc* 造成之神經退化，推論 Ifc 的酵素活性對神經維持功能有其重要性。

Ifc 可將二羥基神經醯胺催化成神經醯胺，而文獻指出神經醯胺含量的多寡可能會影響胞外體分泌數量，因此我們探討 *ifc* 是否會調控胞外體分泌。在果蠅幼蟲眼碟(eye disc)實驗，以 mCD63 蛋白標定胞外體(exosome)，發現過表達 *ifc*(WT)-mCherry 會增加胞外 mCD63 puncta 數量，而失去 *ifc* 則會減少胞外 mCD63 puncta 數量；在果蠅成蟲眼睛中，利用持續活化的 Rab5 (Rab5CA)標定多囊泡體(multivesicular body, MVB)，發現果蠅眼睛失去 *ifc* 會減少胞外體生合成，因此，推論 *ifc* 可能透過調控胞外體生合成來影響胞外體的分泌數量。ESCRT 蛋白(Endosomal Sorting Complex Required for Transport)被認為是調控胞外體生合成的重要角色，所以我們探討 ESCRT 蛋白是否參與 *ifc* 所調控的胞外體生合成。在 ESCRT 蛋白突變(Hrs<sup>D28/+</sup>或 Vps25<sup>A3/+</sup>)的遺傳背景之下，同時過表達 GFP-mCD63 和 *ifc*(WT)-mCherry，發現 Hrs 蛋白突變(Hrs<sup>D28/+</sup>)會減少過表達 *ifc*(WT)-mCherry 所增

加的胞外體分泌數量，代表 Ifc 可能會和 Hrs 蛋白一起調控胞外體生合成。


有研究指出 Rab4 會在網狀紅血球(reticulocyte)成熟時，和釋放的胞外體結合，先前實驗室也發現 Ifc 會和 Rab4 在細胞外共位，因此我們探討 Ifc 執行功能時是否需要 Rab4 協助。不管在 Rab4KO 的遺傳背景下過表達 *ifc*(WT)-mCherry 或在 *ifc*-KO 的遺傳背景下過表達 YFP-Rab4，都可以減緩原本的光依賴性神經退化，所以我們認為 *ifc* 和 Rab4 對光依賴性神經退化的調控屬於兩條獨立的調控路徑且具有互補(complementary)特性。

## 英文摘要



*infertile crescent* (*ifc*) encodes proteins involved in converting dihydroceramide to ceramide. Previously we have found that light stimulation led to light-dependent neurodegeneration in *ifc*-KO photoreceptors. To distinguish the impact on light-dependent neurodegeneration between neurons and glia, we further used *ey3.5*-FLP and *repo*-FLP to generate *ifc*-KO/*ifc*-KO cells in neurons and glia respectively. We found that knockout of *ifc* in neurons or glia resulted in functional degeneration as indicated by electroretinogram (ERG), but only knockout of *ifc* in neurons caused significant morphological degeneration. Also, we observed that expressing *ifc*-mCherry in glia (*repo-ifc*-mCherry) could rescue the degenerating *ifc*-KO photoreceptors, indicating that Ifc in glia partially involved in neuronal maintenance. Furthermore, we found that overexpressing *ifc*( $\Delta$ C3)-mCherry, catalytically mutant *ifc*, in the eye could not rescue the degenerating *ifc*-KO photoreceptors. As a result, we thought that the catalytic domain of Ifc may play an important role in neuronal maintenance.

Overexpressing *ifc*(WT)-mCherry in the eye disc increased the secretion of mCD63 (exosome marker) while knockout of *ifc* decreased the number of mCD63 puncta in distant regions. Furthermore, the colocalization of GFP-mCD63 and Rab5CA (enlarged endosome) showed that the biogenesis of exosome is reduced within the multivesicular



body (MVB) of *ifc*-KO photoreceptors. Altogether, we proposed that *ifc* may mediate the secretion of exosomes at least in regulating exosome biogenesis. Also, cooverexpressing *ifc*(WT)-mCherry and GFP-mCD63 in ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) mutant background (*Hrs*<sup>D28/+</sup>) reduced the secretion of mCD63, indicating that *Ifc* may synergize with *Hrs* to regulate exosome biogenesis.

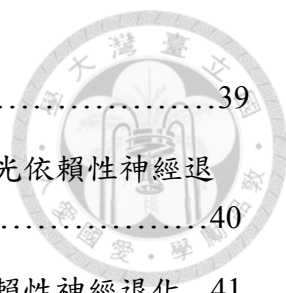
Whether overexpressing *ifc*(WT)-mCherry in *Rab4*KO genetic background or overexpressing YFP-*Rab4* in *ifc*-KO photoreceptors rescued functional degeneration. As a result, we thought that *ifc* and *Rab4* may act as two independent pathways to regulate light-dependent neurodegeneration and compensate each other.

# 目錄



口試委員審定書.....	#
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
目錄.....	vi
第一章 實驗背景.....	1
1.1 <i>ifc</i> 的功能與神經脂質合成.....	2
1.2 果蠅眼睛與 <i>ifc</i> -KO 造成之光依賴性神經退化.....	3
1.3 <i>ifc</i> 的細胞非自主調控和胞外體標記.....	4
1.4 胞外體維持神經功能之重要性.....	6
1.5 胞外體生合成調控.....	7
1.6 小結.....	8
第二章 實驗材料與方法.....	10
2.1 果蠅株及培養方法.....	11
2.2 果蠅食物培養基製備.....	13
2.3 群組分析(Clonal analysis) .....	14
2.4 免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡(IHC & Confocal microscope) .....	14
2.5 免疫螢光染色抗體清單.....	15
2.6 視神經電位紀錄(Electroretinogram) .....	16
2.7 QuickChange 聚合酶連鎖反應(QuickChange PCR) .....	17
第三章 實驗結果.....	20
3.1 剔除視神經細胞中的 <i>ifc</i> 造成視神經在形態和功能上的光依賴性神經退.....	21

3.2 剔除神經膠細胞中的 <i>ifc</i> 造成視神經在功能上出現光依賴性神經退化.....	21
3.3 在神經膠細胞中表現 <i>ifc</i> -mCherry 減緩果蠅眼睛失去 <i>ifc</i> 造成之光依賴性神經退化.....	22
3.4 突變 <i>Ifc</i> 上可能負責酵素催化功能之胺基酸序列降低 <i>Ifc</i> -mCherry 減緩光依賴性神經退化的能力.....	23
3.5 過表達 <i>ifc</i> (WT)-mCherry 造成胞外 mCD63 puncta 數量增加，其調控可能與 <i>Ifc</i> 的酵素活性有關.....	25
3.6 Hrs 蛋白突變(Hrs <sup>D28/+</sup> )使過表達 <i>ifc</i> (WT)-mCherry 所增加的胞外 mCD63 puncta 數量減少.....	26
3.7 失去 <i>ifc</i> 減少胞外 mCD63 puncta 數量.....	27
3.8 失去 <i>ifc</i> 造成多囊泡體中的腔內囊泡數量有減少趨勢.....	28
3.9 失去 <i>ifc</i> 造成多囊泡體生合成減少.....	28
3.10 果蠅眼睛失去 <i>ifc</i> 和全身性失去 Rab4 造成的光依賴性神經退化屬於累加效應.....	29
3.11 <i>ifc</i> 和 Rab4 對光依賴性神經退化的調控具有互補特性.....	29
第四章 實驗討論.....	31
4.1 在視神經或神經膠細胞中失去 <i>ifc</i> 對光依賴性神經退化的影響.....	32
4.2 <i>Ifc</i> ( $\Delta$ CAT)-mCherry 是否真的破壞其酵素活性.....	32
4.3 胞外體標記選擇.....	33
4.4 脂質組成對胞外體的影響.....	33
4.5 <i>Ifc</i> 可能和 ESCRT 蛋白一起調控胞外體分泌.....	34
4.6 <i>ifc</i> 和 Rab4 互補調控在生理上的意義.....	35
第五章 未來實驗方向.....	36
5.1 探討 <i>Ifc</i> 和 ESCRT 蛋白一起調控胞外體分泌的可能機制.....	37
5.2 探討 <i>DEGSI</i> -KO 細胞分泌的胞外體數量和組成.....	37
5.3 探討失去 Rab4 是否會增加胞外體分泌.....	38



第六章 實驗圖表.....	39
Fig. 1 剔除視神經細胞中的 <i>ifc</i> 造成視神經在形態和功能上的光依賴性神經退化.....	40
Fig. 2 剔除神經膠細胞中的 <i>ifc</i> 造成視神經在功能上出現光依賴性神經退化...41	
Fig. 3 在神經膠細胞中表現 <i>ifc</i> -mCherry 減緩果蠅眼睛失去 <i>ifc</i> 造成之光依賴性神經退化.....	42
Fig. 4 突變 <i>Ifc</i> 上可能負責酵素催化功能之胺基酸序列降低 <i>Ifc</i> -mCherry 減緩光依賴性神經退化的能力.....	43
Fig. 5 過表達 <i>ifc</i> (WT)-mCherry 造成胞外 mCD63 puncta 數量增加，其調控可能與 <i>Ifc</i> 的酵素活性有關.....	44
Fig. 6 <i>Hrs</i> 蛋白突變( <i>Hrs</i> <sup>D28/+</sup> )使過表達 <i>ifc</i> (WT)-mCherry 所增加的胞外 mCD63 puncta 數量減少.....	45
Fig. 7 失去 <i>ifc</i> 減少胞外 mCD63 puncta 數量.....	46
Fig. 8 失去 <i>ifc</i> 造成多囊泡體中的腔內囊泡數量有減少趨勢.....	47
Fig. 9 失去 <i>ifc</i> 造成多囊泡體生合成減少.....	48
Fig. 10 果蠅眼睛失去 <i>ifc</i> 和全身性失去 <i>Rab4</i> 造成的光依賴性神經退化屬於累加效應.....	49
Fig. 11 <i>ifc</i> 和 <i>Rab4</i> 對光依賴性神經退化的調控具有互補特性.....	50
Supplementary Fig. 1 <i>repo</i> 啟動子作用範圍不包含神經細胞.....	51
Supplementary Fig. 2 <i>Ifc</i> (WT)-mCherry 和 <i>Ifc</i> ( $\Delta$ C3)-mCherry 的蛋白表現量無顯著差異.....	52
第七章 參考文獻.....	53





# 第一章 實驗背景



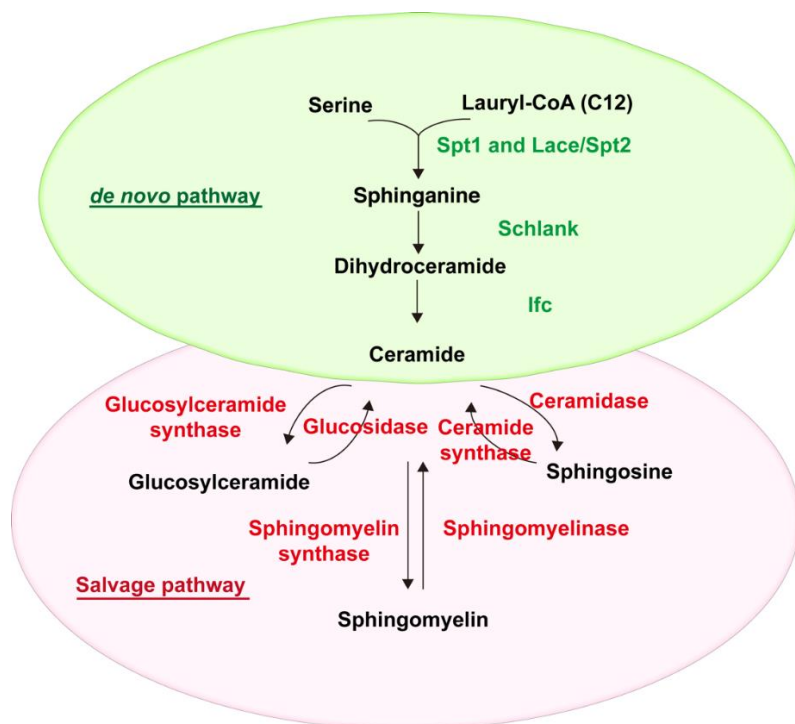
## 1.1 *ifc* 的功能與神經脂質合成

果蠅的 *ifc* (*infertile crescent*) 為人類 *DEGSI* 之同源基因，其中，*ifc* 與 *DEGSI* 之胺基酸序列有 62% 的一致性(identity)和 75% 的相似性(similarity)，顯示其在演化上有高度的保守性(conservation)。在公果蠅的精子形成(spermatogenesis)過程中，*ifc* 扮演啟動減數分裂(meiosis)之重要角色[1]，而果蠅若全身性失去 *ifc* 會有發育遲緩且在二齡幼蟲就死亡的現象[2]。Ifc 也具有酵素(enzyme)的催化功能，其參與神經脂質(sphingolipid)的從頭合成路徑(*de novo* pathway)，負責將二羥基神經醯胺(dihydroceramide)催化成神經醯胺(ceramide)。合成神經脂質的相關酵素一般被認為作用於內質網(endoplasmic reticulum)或高基氏體(Golgi apparatus)等胞器(organelle)[3]，然而，根據實驗室先前的發表[2]，我們發現 Ifc 在果蠅視神經細胞中主要會和胞內體(endosome)或晚期胞內體(late endosome)的標記(marker)共位(colocalization)。

神經脂質是真核生物細胞膜的主要成分，大約占細胞中所有脂質的 10-20%，其組成會影響細胞膜的流動性(fluidity)、厚度(thickness)、彎曲程度(curvature)，所以神經脂質在蛋白派送(protein sorting)和訊息傳遞(signal transduction)中扮演重要的角色[4]。神經脂質之形成主要可經由神經脂質的從頭合成路徑[5][6]和再利用路徑(salvage pathway)[7][8]，而神經醯胺就是連結這兩條路徑的中心，目前已知神經醯胺的功能除了可以當作結構性的脂質，也能作為第二傳訊者(second messenger)參與細胞增生(proliferation)、分化(differentiation)、老化(senescence)、凋亡(apoptosis)等調控[5]。除了神經醯胺之外，神經鞘胺醇(sphingosine)也是參與訊息傳遞調控的常見神經脂質，研究指出神經鞘胺醇激酶(sphingosine kinase, SphK)藉由將神經鞘胺醇轉變成水溶性的鞘胺醇 1-磷酸鹽(sphingosine-1-phosphate, S1P)來調控細胞膜的動態變化(membrane dynamic)，進而影響細胞的胞吞作用(endocytosis)與胞吐作用(exocytosis)[9]。線蟲的神經鞘胺醇激酶-1 (SphK-1)位於神經突觸前末端，線蟲失去神經鞘胺醇激酶-1，雖然不影響神經正常發育，但是神經肌肉接合處



(neuromuscular junction)釋放神經傳導物質的功能會受損，若以蕁毒鹼活化劑 (muscarinic agonist)刺激使突觸前的神經鞘胺醇激酶-1 增加，則會促使神經傳導物質釋放[10]。



(游宇蓮，碩士論文，台大生理所 2016)

圖一、神經脂質的從頭合成路徑和再利用路徑

## 1.2 果蠅眼睛與 *ifc*-KO 造成之光依賴性神經退化

果蠅的 1 個複眼(compound eye)約由 800 個小眼(ommatidium)所組成，每個小眼具有 20 個細胞，其中包含 8 個感光細胞(photoreceptor cell)，6 個感光細胞(R1-6)延伸於約 85 微米(micrometer)厚的視網膜(retina)中，而另外 2 個感光細胞(R7 和 R8)則只分別位於小眼的遠端(distal)和近端(proximal)側，每個感光細胞含有 1 個負責接收光刺激的桿狀小體(rhabdomere) [11][12]。因為桿狀小體是由很多微絨毛(microvillus)所組成的緻密結構，提供了大量的細胞膜表面可以聚集很多視紫質(rhodopsin)和負責光傳導(phototransduction)的相關蛋白，其中，Rhodopsin 1 (Rh1)



為主要表現在 R1-6 的視紫質[13][14]。

有研究指出，將患有中樞(central)和周邊(peripheral)神經系統退化的多重系統退化症(multisystem neurological disorder)之病人進行全外顯子定序(whole-exome sequencing)，發現 *ifc* 的人類同源基因 *DEGSI*，其胺基酸序列上第 280 個胺基酸從丙胺酸(alanine)突變成纈胺酸(valine)，且病患血液的神經脂質組成(blood sphingolipid profile)從不飽和(unsaturated)大量轉變成二羥基形式(dihydro-forms)的神經脂質，更會形成可能具有毒性的神經脂質代謝產物，推論患有此疾病的病患失去 *DEGSI* 的功能，因此，作者認為 *DEGSI* 缺失是新發現造成多重系統退化症的原因 [15]。也有另一篇文獻提到，以全外顯子定序分析腦白質病(leukoencephalopathy)患者，發現在其中 19 位病患中，*DEGSI* 基因突變是造成發病的原因[16]。根據實驗室先前的發表[2]，我們發現在果蠅眼睛將 *ifc* 剔除會導致二羥基神經醯胺含量增加，而且在照光 10 天的刺激之下，果蠅視神經細胞(photoreceptor)在形態和功能上皆出現較嚴重的神經退化，經由一系列的遺傳分析(genetic analysis)，我們推論 *ifc*-KO 造成的光依賴性(light-dependent)神經退化是因為二羥基神經醯胺累積所導致。

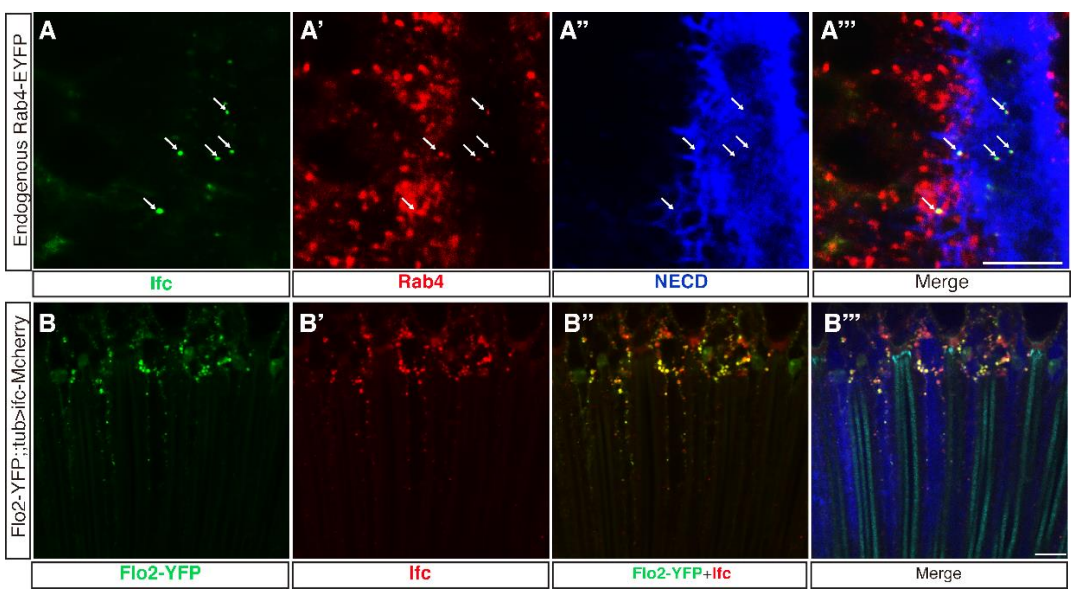
### 1.3 *ifc* 的細胞非自主調控和胞外體標記

實驗室先前的發表[2]也提到，全身性將 *ifc* 剔除會導致個體發育遲緩且在二齡幼蟲的階段就會死亡，而利用 *tub*-Gal4 在全身性過表達 *ifc* 或 *ifc*-mCherry 皆可以拯救個體的死亡，若利用 *elav*-Gal4、*repo*-Gal4、*mef2*-Gal4 分別只在神經組織、神經膠細胞(glia)、肌肉組織過表達 *ifc* 或 *ifc*-mCherry，也可以低程度的拯救個體死亡，因此，我們推論拯救個體死亡的效果可能是經由細胞非自主(cell non-autonomous)調控。此外，我們也發現在鄰近視神經細胞的神經膠細胞、視錐細胞(cone cell)、色素細胞(pigment cell)過表達(overexpress) *ifc*-mCherry，可以在視神經細胞中偵測到 *Ifc*-mCherry 的訊號，代表 *Ifc* 可能是以旁分泌(paracrine)的方式被提



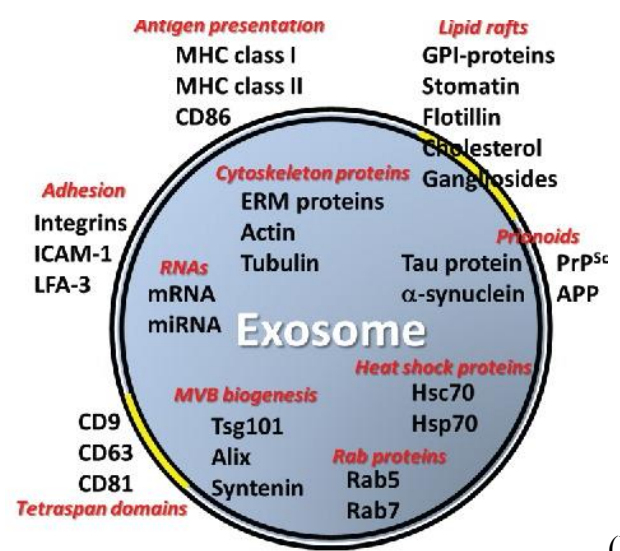
供給視神經細胞。

Ifc 在果蠅視神經細胞中會和胞內體或晚期胞內體的標記共位，實驗室的游宇蓮學姊也發現 Ifc 會在細胞外和 Rab4、Flo2 等胞外體(exosome)標記共位，因此推測 Ifc 有可能會以胞外體的形式被送出細胞外。



(credited to 游宇蓮學姊)

圖二、 Ifc 在細胞外和 Rab4、Flo2 等胞外體標記共位



(Blanc & Vidal, 2017)

圖三、胞外體的可能組成與其上的標記蛋白，其中 CD63 為常見的標記之一



#### 1.4 胞外體維持神經功能之重要性

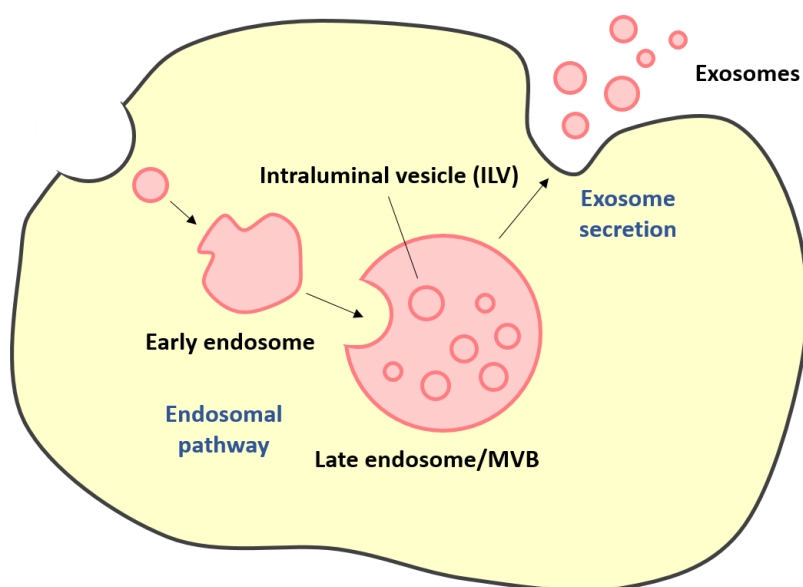
胞外體分泌在一般生理(physiological)和病理(pathological)的情況下皆會受到調控，但先前對胞外體的研究多著重在病理情況下的調控，最常見的有神經退化性疾病[17]和癌症[18]相關的研究。在中樞神經系統中的研究，胞外體被認為會攜帶一些致病性蛋白(例如： $\alpha$ -synuclein、 $\beta$ -類澱粉蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )、磷酸化 Tau 蛋白)在細胞和細胞之間傳遞，這種像普里昂蛋白(prion-like)在細胞之間傳播感染的途徑被認為是導致神經退化性疾病的其中一項可能原因[19]。然而，有越來越多的證據指出胞外體會一般在生理情況下參與突觸功能、神經發育、神經功能維持等等的調控[20][21]。Bahrini 等人發現神經細胞分泌含有微小 RNA (microRNA, miRNA) 的胞外體可以活化微膠細胞(microglia)的吞噬作用(phagocytosis)，進而清除神經退化的樹突(dendrite) [22]；Bulloj 和 Tamboli 等人則提出內含胰島素分解酵素(insulin degrading enzyme)的胞外體可以促進  $\beta$ -類澱粉蛋白的分解[23][24]；Yuyama 等人也提出神經分泌的胞外體可以改變  $\beta$ -類澱粉蛋白的構型以形成無毒性的類澱粉蛋白纖維(amyloid fibril)，並促進微膠細胞將其分解[25]。

從細胞生物學的角度來看，細胞為了維持正常的功能，會將細胞中沒有用處或是有害的物質清除，而清除廢物的方式除了利用溶酶體(lysosome)將物質分解之外，細胞還能以胞外體的形式將廢物送出細胞外以減少對細胞自身的傷害[26][27]。細胞透過內體生成路徑(endosomal pathway)，最終會形成多囊泡體，而多囊泡體中所包覆的物質，可以進一步以溶酶體分解或胞外體分泌的方式清除，有越來越多的證據認為胞外體分泌可以當成溶酶體清除的替代路徑[28]。Alvarez-Erviti 等人以抑制溶酶體的藥物 Bafilomycin A 處理表現  $\alpha$ -synuclein 的細胞，發現會增加胞外體上  $\alpha$ -synuclein 的含量[29]；Vingtdeux 等人利用另一種抑制溶酶體的藥物 chloroquine，發現胞外體上  $\beta$ -類澱粉蛋白前驅蛋白的 C 端結構( $\beta$ -amyloid precursor protein C-terminal intracellular domain, ACID)含量會增加[30]；Simon 和 Wren 等人則以突變的 Tau 蛋白誘導抑制溶酶體，也觀察到胞外體上的 Tau 蛋白表現量增加[31][32]。



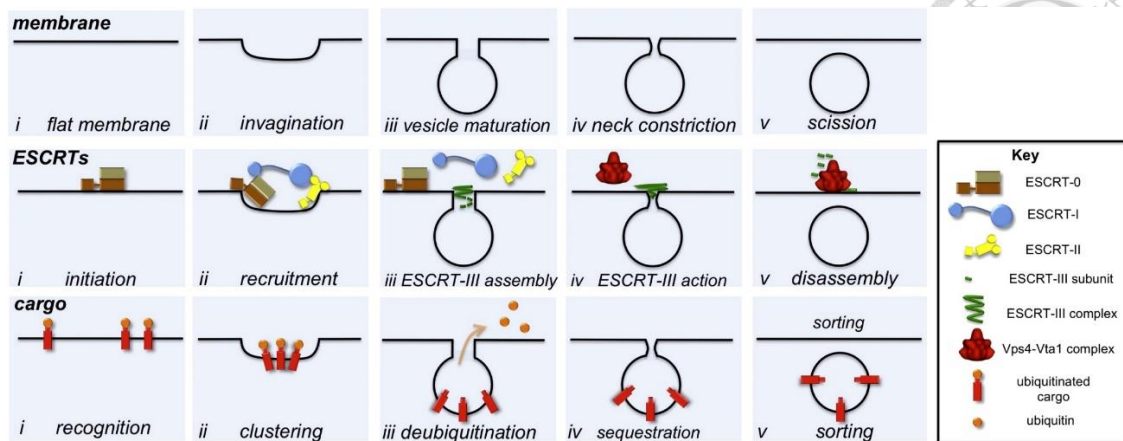
## 1.5 胞外體生合成調控

胞外體(exosome)是一種會被分泌到細胞外的小囊泡(vesicle)，大小約為直徑 40 到 100 奈米(nanometer)，目前已經知道許多種類的細胞都會分泌胞外體，其中包含神經細胞[33][34]。胞外體一開始是由早期胞內體(early endosome)上的膜向內凹陷所形成[35]，此時早期胞內體轉變成內含許多腔內囊泡(intraluminal vesicle, ILV)的多囊泡體(multivesicular body, MVB)，當多囊泡體的膜和細胞膜結合後會將腔內囊泡釋放到細胞外，此時分泌到細胞外的囊泡就稱為胞外體[36]。



圖四、胞外體生合成路徑

胞外體的生合成(biogenesis)普遍被認為至少由以下兩種機制中的其中一種所調控，分別為 ESCRT 蛋白(Endosomal Sorting Complex Required for Transport)或神經醯胺(ceramide)參與的調控[37][38]。ESCRT 蛋白調控的步驟主要包含：(i) ESCRT-0 召集(recruit)被泛蛋白(ubiquitin)標定的蛋白，(ii) ESCRT-1 連結 ESCRT-0 和 ESCRT-2 以協助早期胞內體膜的內陷，(iii) ESCRT-2 召集 ESCRT-3 次單元(subunit)聚集並組裝，(iv) ESCRT-3 複合體(complex)協助內陷的腔內囊泡膜與早期胞內體分離，(v) Vps4 這種腺苷三磷酸酶(adenosine triphosphatase; ATPase)會把 ESCRT-3 複合體分解成次單元以回收利用[39][40]。



(Henne *et al.*, 2011)

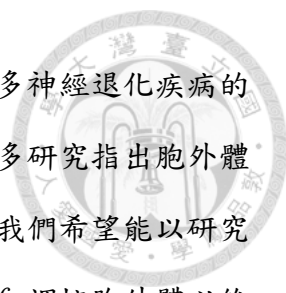
圖五、ESCRT 蛋白協助腔內囊泡形成

胞外體的形成也可以透過 ESCRT 蛋白以外的機制所調控(例如：由神經脂質代謝相關酵素改變神經醯胺含量來調控胞外體的生合成)，研究指出增加神經醯胺的含量可以觸發(trigger)早期胞內體的膜向內凹陷形成腔內囊泡[41]，Trajkovic 等人發現藉由藥物 GW4869 或 siRNA 減量(siRNA knockdown)抑制中性神經磷脂酶(neutral sphingomyelinase, nSMase)來阻斷神經磷脂(sphingomyelin)轉換成神經醯胺會減少寡樹突細胞(oligodendrocyte)分泌胞外體[42]；Yuyama 等人也提出減少神經磷脂合成酶(sphingomyelin synthase, SMS)進而增加神經醯胺含量會使神經母細胞瘤細胞(neuroblastoma cell line)分泌較多胞外體[25]。

## 1.6 小結

根據實驗室之前對 *ifc* 的研究，我們目前已知果蠅眼睛失去 *ifc* 會產生光依賴性神經退化且會增強自噬作用；在神經以外的組織過表達 *ifc*，可以經由細胞非自主調控低程度拯救個體死亡；免疫螢光染色中 *Ifc* 會分別和 Rab4(早期胞內體)或 Rab7(晚期胞內體)共位，代表 *Ifc* 可能位於早期胞內體轉變成晚期胞內體過程中的多囊泡體上；*Ifc* 在細胞外和 Rab4、Flo2 等胞外體標記共位；*Ifc* 可將二羥基神經醯胺催化成神經醯胺，而神經醯胺被認為可能會調控胞外體分泌。根據上述，我們





想知道 *ifc* 是否會調控胞外體分泌，且又是如何調控。雖然在很多神經退化疾病的研究中，胞外體被認為是使病情惡化的可能因素，然而有越來越多研究指出胞外體維持神經功能的重要性，但這方面的研究仍然較不完整。因此，我們希望能以研究 *ifc* 如何調控胞外體為起點，延伸到神經功能維持，進而串連起 *ifc* 調控胞外體以維持神經功能的大方向。



# 第二章

## 實驗材料與方法



## 2.1 果蠅株及培養方法

實驗果蠅飼養在標準培養基中，放置於室溫環境或 25°C 的恆溫培養箱。

果蠅株	基因型	來源
<i>ey3.5-FLP</i>	P{w[+mC]=ey3.5-FLP.B}1, y[1] w[*]; CyO/In(2LR)Gla, wg[Gla-1] PPO1[Bc]	Bloomington stock center #35542
cl, FRT40A	y[d2] w[1118] P{ry[+t7.2]=ey-FLP.N}2 P{GMR-lacZ.C(38.1)}TPN1; l(2)cl-L3[1] P{w[+t*] ry[+t*]=white-un1}30C P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A/CyO, y[+]	Bloomington stock center #5622
FRT40A	y[d2] w[1118] P{ry[+t7.2]=ey-FLP.N}2 P{GMR-lacZ.C(38.1)}TPN1; P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A	Bloomington stock center #5615
<i>ifc</i> -KO, FRT40A	w <sup>1118</sup> ; <i>ifc</i> -KO, P{neoFRT}40A/CyO-GFP	本實驗室製備
<i>repo</i> -FLP	w <sup>1118</sup> ; Sp/Cyo; <i>repo</i> -FLP/TM3, Sb	
GMR> <i>w</i> RNAi	y[1] w[*]; P{w[+mC]=UAS-Cpn.RNAi}9; P{y[+*]=GMR-GAL4,UAS-w.RNAi}3	Bloomington stock center #43344
<i>repo</i> -Gal4	w[1118]; P{w[+m*]=GAL4}repo/TM3, Sb[1]	Bloomington stock center #7415
UAS-mCD8-GFP	y[1] w[*]; P{w[+mC]=UAS- mCD8::GFP.L}LL5, P{UAS- mCD8::GFP.L}2	Bloomington stock center #5137
UAS- <i>ifc</i> (WT)- mCherry	w <sup>1118</sup> ; P{UAS <i>Tattb-ifc</i> (WT)-mCherry}3	本實驗室製備

<i>repo-ifc-mCherry</i>	Sp/Cyo; <i>repo-ifc-mCherry</i> /TM3, Sb	本實驗室製備
UAS- <i>ifc</i> ( $\Delta$ CAT)- mCherry	w <sup>1118</sup> ; P{UASTattb- <i>ifc</i> ( $\Delta$ CAT)-mCherry}3	本實驗室製備
<i>tub-Gal4</i>	y[1] w[*]; P{w[+mC]=tubP- GAL4}LL7/TM3, Sb[1] Ser[1]	Bloomington stock center #5138
<i>nSyb-GAL4</i>	y[1] w[*]; P{w[+m*]=nSyb-GAL4.S}3	Bloomington stock center #51635
<i>DE-Gal4</i>	y[1] w[*]; wg[Sp-1]/CyO; P{w[+mW.hs]=GawB}mirr[DE]/TM3, Sb[1]	Bloomington stock center #29650
UAS-mCherry- CAAX	w[*]; P{w[+mC]=UAS- mCherry.CAAX.S}2	Bloomington stock center #59021
UAS-GFP- mCD63 (II)	UAS-GFP-mCD63/CyO; Dr/TM3, Sb	From Suzanne Eaton
Hrs <sup>D28</sup>	P{ry[+t7.2]=hsFLP}12, y[1] w[*]; Hrs[D28] P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A/In(2LR)Gla, wg[Gla-1] PPO1[Bc]	Bloomington stock center #54574
Vps25 <sup>A3</sup>	w[*]; Vps25[A3] P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D/CyO, P{w[+mC]=GAL4-twi.G}2.2, P{UAS- 2xEGFP}AH2.2	Bloomington stock center #39633

UAS-GFP-mCD63 (III)	Sp/CyO; UAS-GFP-mCD63/TM3, Sb	本實驗室將此轉殖基因從第二條染色體跳至第三條
<i>rhl</i> -Gal4, <i>eyFLP</i>	P{ry[+7.2]= <i>rh1</i> -GAL4}1, P{ry[+7.2]= <i>eyFLP.N</i> }2; P{w[+mC]=UAS-GFP- <i>ninaC</i> }2; P{w[+mC]= <i>ninaE</i> -tdTomato- <i>ninaC</i> }3L P{ry[+7.2]= <i>neoFRT</i> }80B/TM6B, Tb[1]	Bloomington stock center #43347
UAS-Rab5CA	w[*]; P{w[+mC]=UAS-Rab5[Q88L]}3	Bloomington stock center #43335
Rab4KO	Rab4-ATG-Gal4KO #70	From Hiesinger lab
UAS-YFP-Rab4	y[1] w[*]; P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab4}Sap-r[32]	Bloomington stock center #9767

## 2.2 果蠅食物培養基製備

1 L 食物所需材料：

純水	Agar	葡萄糖	紅糖	玉米粉	酵母粉
1 L	7 g	36.75 g	18.3 g	31.822 g	42 g

將上述材料放入鍋中加熱並持續攪拌至沸騰，待降溫至 70°C 後，加入防腐劑 10 mL 及營養劑 8.08 mL。

防腐劑 1 L 配方：P-hydroxy benzoic acid methyl ester 200 g+酒精 800 g

營養劑 1 L 配方：Propionic acid 418 mL+85% phosphoric acid 41.5 mL+水 540.5 mL



## 2.3 群組分析(Clonal analysis)

為了研究對早期發育重要的基因 *ifc*(全身性失去 *ifc* 會導致果蠅在三齡幼蟲的階段死亡)，我們利用果蠅研究中常見的 FLP/FRT 重組技術[43][44]於特定組織中產生 *ifc* 突變細胞群組(mutant clone)，包含以 *eyFLP* (*eyeless*-FLP) [45]、*ey3.5*-FLP [46]、*repo*-FLP [47]分別在果蠅眼睛、視神經細胞、神經膠細胞中產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞(*ifc*-KO/*ifc*-KO)。

## 2.4 免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡(IHC & Confocal microscope)

### 果蠅成蟲視神經免疫螢光染色

將果蠅成蟲眼睛於 1 倍磷酸鹽緩衝生理鹽水(1X PBS)中解剖分離，於 4%多聚甲醛(含 4% paraformaldehyde 的 1X PBS)中固定 20 分鐘，接著以 0.4% PBST 緩衝液(含 0.4% Triton X-100 的 1X PBS)於振盪器上清洗 3 次，每次 10 分鐘，再以含螢光耦合鬼筆環肽(Alexa Fluor™ Phalloidin; 標定桿狀小體)(濃度 1:200)和  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 抗體(DSHB #a5; 標定神經細胞膜)(濃度 1:50)的 0.4% PBST 緩衝液於 4°C 冷房的振盪器上染色 20~24 小時。以 0.4% PBST 緩衝液於振盪器上清洗 3 次，每次 10 分鐘，再以含螢光耦合二抗(濃度 1:500)的 0.4% PBST 緩衝液於 4°C 冷房的振盪器上染色 12~16 小時。以 0.4% PBST 緩衝液於振盪器上清洗 3 次，每次 10 分鐘，最後以 VECTASHIELD® Mounting Medium 和指甲油封片。

### 果蠅幼蟲眼碟(eye disc)免疫螢光染色

將果蠅三齡幼蟲的眼碟於 1 倍磷酸鹽緩衝生理鹽水中解剖分離，於 4%多聚甲醛中固定 18 分鐘，接著以 0.4%PBST 緩衝液於振盪器上清洗 3 次，每次 10 分鐘，再以含 DAPI (標定細胞核)(0.2  $\mu\text{L}$ )和 mCD63 抗體(DSHB #H5C6; 標定胞外體)(濃度 1:200)的 0.4% PBST 緩衝液於 4°C 冷房的振盪器上染色 20~24 小時。以 0.4% PBST 緩衝液於振盪器上清洗 3 次，每次 10 分鐘，再以含螢光耦合二抗(濃度 1:500)的 0.4% PBST 緩衝液於 4°C 冷房的振盪器上染色 12~16 小時。以 0.4% PBST 緩衝



液於振盪器上清洗 3 次，每次 10 分鐘，最後以 VECTASHIELD® Mounting Medium 和指甲油封片。

#### 共軛焦顯微鏡(Confocal microscope)使用

顯微鏡型號：Leica TCS SP5 和 LSM880

實驗所使用物鏡：10X, 40X (oil), 63X (oil)

實驗所使用雷射：405 nm, 488 nm, 543 nm, 633 nm

影像擷取軟體：LAS AF 和 ZEN 2011

擷取影像：SP5 Format 為 1024 X 1024，Speed 為 100 Hz，Line Average 為 4。

LSM880 Format 為 1024 X 1024，Speed 為 5。

#### 影像處理(Image processing)

於 Adobe Photoshop CS6 軟體中調整影像亮度(intensity)與對比(contrast)，影像的顏色轉換(color change)與疊圖(merge)於 ImageJ 軟體(NIH, Bethesda, MD)中進行，影像儲存與輸出格式為 TIF 檔。

### 2.5 免疫螢光染色抗體清單

一抗和染劑			
名稱	抗原或染劑說明	來源	染色濃度
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	F-actin	Life Technologies #A12379	1:200
Alexa Fluor™ 568 Phalloidin	F-actin	Life Technologies #A12380	1:200
Alexa Fluor™ 647 Phalloidin	F-actin	Life Technologies #A22287	1:200

anti-Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	ATPase, (Na (+) K(+)) alpha subunit	DSHB #a5	1:50
anti-elav	elav <i>Drosophila</i> protein; embryonic lethal abnormal vision	DSHB #7E8A10	1:200
anti-Repo	Repo; Reversed polarity protein	DSHB #8D12	1:200
anti-mCD63	CD63 (human) LAMP-3	DSHB #H5C6	1:200
anti-Rab5	within residues 200 to the C-terminus of <i>Drosophila melanogaster</i> Rab5	Abcam #ab31261	1:200
DAPI	核酸和染色體複染劑，與 DNA 的 AT 區域結合後能發出藍色螢光	Life Technologies #D1306	0.2 μL

二抗		
名稱	來源	染色濃度
anti-mouse 405	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
anti-mouse Cy3	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
anti-mouse 647	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
anti-rabbit Cy3	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
anti-rat 647	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500

## 2.6 視神經電位紀錄(Electroretinogram)

在硬體連接方面，將玻璃電極固定於三向儀後，將其與四頻道搖傳式紀錄器連接，再將紀錄器和訊號放大器(intracellular electrometer IE-210)連接，以將電訊號轉為數位訊號，訊號放大器接地且玻璃電極在銅網內進行記錄，以避免雜訊干擾。

以拉針器(Sutter instrument co. ; Sutter P97)拉出特定細度的視神經電位紀錄用





針，拉針步驟如下：

Pressure=500

Heat: 615, Pull=35, Vel.=20, Del.=100

Heat: 565, Pull=30, Vel.=20, Del.=100

Heat: 565, Pull=30, Vel.=20, Del.=100

Heat: 565, Pull=25, Vel.=15, Del.=100

Heat: 545, Pull=20, Vel.=10, Del.=100

Heat: 535, Pull=20, Vel.=10, Del.=100

進行實驗時，先將果蠅的左半側以無毒性白膠小心固定至載玻片上，同時確保未碰觸右半側的眼睛，再將載玻片移至黑暗處等待白膠風乾，接著以 2 M NaCl 溶液填充玻璃參考電極和紀錄電極，參考電極插入果蠅第二體節的柔軟處，紀錄電極輕觸右半側眼睛，由電腦軟體控制光刺激，刺激強度固定在 3000 Lux，每次刺激持續 1 秒，每隻果蠅至少測出連續 5 個較穩定的波形。

使用 Lab scribe 2 進行數據分析，每一組別每次約測量 10 隻左右的果蠅且至少重複 3 次，每隻果蠅選出最具代表性的波形進行量化。

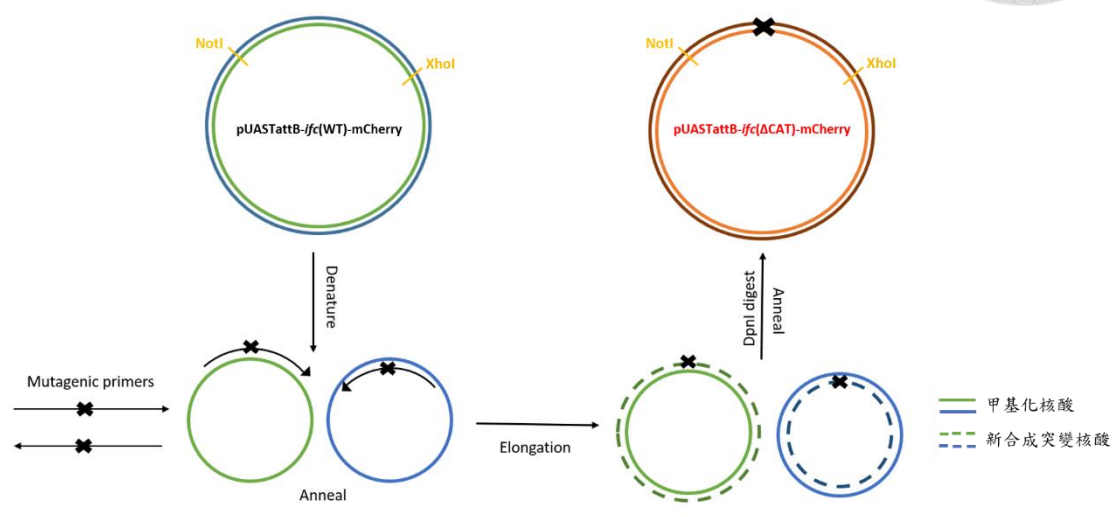
## 2.7 QuickChange 聚合酶連鎖反應(QuickChange PCR)

QuickChange 聚合酶連鎖反應是一種利用引子(primer)設計進行定點突變(site-directed mutagenesis)的方法，通常引子長度約為 25 到 35 個鹼基對(base pair)，而所要改變的核苷酸(nucleotide)序列位於整個引子序列的中心。聚合酶連鎖反應完後，於 50  $\mu$ L 反應液體中加入 1  $\mu$ L Dpn1 酵素和 5  $\mu$ L CutSmart 緩衝液，放置在 37°C 培養箱中 1 小時讓酵素作用，Dpn1 酵素可將甲基化(methylated)的模版股(template strand)分解，確保只留下新合成具有突變序列的核酸(nucleic acid)，接著藉由轉形作用(transformation)篩選出成功合成完整質體(plasmid)的核酸。

突變後的核酸經定序(sequence)確認目標基因(insert)之序列正確後，需在利用



限制酶(restriction enzyme)將目標基因切下，連接(ligate)回未經聚合酶連鎖反應的載體(vector)以確保載體沒有不必要的突變。



聚合酶連鎖反應材料：

DNA template (100 ng/μL)	1 μL
forward primer (10 μM)	1.25 μL
reverse primer (10 μM)	1.25 μL
DNA polymerase	1 μL
5 X buffer	10 μL
dNTP (10 mM)	2 μL
DMSO	3 μL
ddH <sub>2</sub> O	30.5 μL
Total volume	50 μL



聚合酶連鎖反應條件：

步驟		溫度(°C)	時間
初始變性 (Initial denaturation)		95°C	1 分
15 個循環(cycle)	變性 (Denaturation)	95°C	50 秒
	接合 (Annealing)	50-60°C	50 秒
	延伸 (Elongation)	68°C	18 分
最終延伸 (Final elongation)		68°C	7 分
最終溫度 (Final hold)		12°C	∞

引子序列：

ifc-CAT-FWD-1	GCCGAGATCTCGGCCAACCTGGCC
ifc-CAT-REVCOMP-1	GGCCGAGATCTCGGCAACGGCCAG
ifc-CAT-FWD-2	GCCCTGGAAGCCGCCCGTTACCAA
ifc-CAT-REVCOMP-2	GGCGGCTTCCAGGGCGTACTTTTT
ifc-CAT-FWD-3	GCCAACGAGGCCCGCCGACTTTCCG
ifc-CAT-REVCOMP-3	GGCGGCCTCGTTGGCGTAGCCCAC



# 第三章

## 實驗結果

### 3.1 剔除視神經細胞中的 *ifc* 造成視神經在形態和功能上的光依賴性神經退化

先前實驗室利用 *eyFLP* 在果蠅眼睛產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞(*ifc*-KO/*ifc*-KO)，以免疫螢光染色實驗確認視神經細胞的形態，加上視神經電位紀錄確認視神經的功能，在照光 10 天之後，眼睛失去 *ifc* 的組別和控制組相比，其視神經在形態和功能上皆出現比較退化的情況，因此推論果蠅眼睛失去 *ifc* 會造成光依賴性(light-dependent)神經退化[2]。然而，因為 *eyFLP* 作用的範圍涵蓋視神經細胞以及其周圍的視神經膠細胞，所以進一步探討只將視神經細胞或視神經膠細胞中的 *ifc* 剔除，對光依賴性神經退化造成的影響。

我們利用只作用在視神經細胞的 *ey3.5-FLP* 在果蠅視神經產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞，在照光 10 天之後，以免疫螢光染色實驗確認其視神經細胞的形態，免疫螢光染色中以鬼筆環肽(phalloidin)標定桿狀小體(rhabdomere)； $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 標定神經細胞膜。視神經細胞失去 *ifc* 的組別和控制組相比，其鬼筆環肽所標定的桿狀小體數目顯著減少，且  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 所標定的神經細胞膜也較不規則或萎縮(Fig. 1A-C)，推論果蠅視神經細胞失去 *ifc* 會造成視神經在形態上出現光依賴性神經退化。

另外，我們也以視神經電位紀錄確認視神經的功能，在照光 10 天之後，視神經細胞失去 *ifc* 的組別和控制組相比，其代表神經功能的去極化(depolarization)振幅會顯著下降(Fig. 1D, E)，推論果蠅視神經細胞失去 *ifc* 會造成視神經在功能上出現光依賴性神經退化。

### 3.2 剔除神經膠細胞中的 *ifc* 造成視神經在功能上出現光依賴性神經退化

我們也利用只作用在神經膠細胞的 *repo-FLP* 在果蠅神經膠細胞產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞，在照光 10 天之後，以免疫螢光染色實驗確認其視神經細胞的形態，免疫螢光染色中以鬼筆環肽標定桿狀小體； $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 標定神經細胞膜。神經膠細胞失去 *ifc* 的組別和控制組相比，其鬼筆環肽所標定的桿狀小體和  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

ATPase 所標定的神經細胞膜在形態上有些微較不完整(Fig. 2A, B)，但在桿狀小體數目的統計上並無顯著差異(Fig. 2C)，推論果蠅神經膠細胞失去 *ifc* 並不會造成視神經在形態上有顯著的光依賴性神經退化。

另外，我們也以視神經電位紀錄確認視神經的功能，在照光 10 天之後，神經膠細胞失去 *ifc* 的組別和控制組相比，其代表神經功能的去極化振幅會顯著下降(Fig. 2D, E)，推論果蠅神經膠細胞失去 *ifc* 會造成視神經在功能上出現光依賴性神經退化。

### 3.3 在神經膠細胞中表現 *ifc*-mCherry 減緩果蠅眼睛失去 *ifc* 造成之光依賴性神經退化

先前實驗室發現，利用 *repo*-Gal4 在神經膠細胞中過表達(overexpress) *ifc*-mCherry，可以在視神經細胞中看到 *Ifc*-mCherry，代表 *Ifc*-mCherry 可能會從神經膠細胞中移動到視神經細胞[2]。因此，我們想進一步知道只在神經膠細胞中表現 *ifc*-mCherry，是否能拯救果蠅眼睛失去 *ifc* 造成之光依賴性神經退化。

為了減少眼睛色素的保護功能，我們利用 *GMR*-Gal4 在眼睛過表達 *w* RNAi 減少眼睛色素，但因為已經有 *GMR*-Gal4，所以在此遺傳背景(genetic background)下無法在利用 *repo*-Gal4 在神經膠細胞中過表達 *ifc*-mCherry，為了解決在同一個遺傳背景下無法使用兩種不同 Gal4 的困境，實驗室的林志維學弟製作了在 *repo* 啟動子(promoter)後接 *ifc*-mCherry 基因序列的果蠅(*repo-ifc*-mCherry)，以利持續在神經膠細胞中表現 *ifc*-mCherry。

我們利用 *eyFLP* 在果蠅眼睛產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞，同時以 *GMR*-Gal4 在眼睛過表達 *w* RNAi 當作控制組(*ifc*-KO)，並在此遺傳背景下利用 *GMR*-Gal4 在眼睛過表達 *ifc*-mCherry (*GMR>ifc*(WT)-mCherry)，或在神經膠細胞中表現 *ifc*-mCherry (*repo-ifc*-mCherry)作為實驗組，在照光 10 天之後，以免疫螢光染色實驗確認其視神經細胞的形態，免疫螢光染色中以鬼筆環肽標定桿狀小體； $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase

標定神經細胞膜。GMR>ifc(WT)-mCherry 和 repo-ifc-mCherry 相較於 ifc-KO 的組別，其鬼筆環肽所標定的桿狀小體數目皆有顯著增加(Fig. 3A-D)，且在視神經電位紀錄中，其代表神經功能的去極化振幅也皆有顯著上升(Fig. 3E, F)，推論在神經膠細胞中表現 ifc-mCherry 就能減緩果蠅眼睛失去 ifc 造成之光依賴性神經退化。

為了排除 repo 啟動子的作用範圍可能包含部分神經細胞之可能性，藉由免疫螢光染色實驗確認，以 repo-Gal4 過表達 mCD8-GFP 標定 repo 啟動子作用位置，同時以 α-repo 標定神經膠細胞，以 α-elav 標定神經細胞，觀察 mCD8-GFP 的訊號是否會出現在 α-elav 所標定之神經細胞中，實驗結果發現標定 repo 啟動子作用位置之 mCD8-GFP 訊號並不會和標定神經細胞之 α-elav 訊號共位，因此我們認為 repo 啟動子作用範圍不包含神經細胞(Supplementary Fig. 1)。

### 3.4 突變 Ifc 上可能負責酵素催化功能之胺基酸序列降低 Ifc-mCherry 減緩光依賴性神經退化的能力

為了研究 Ifc 的酵素(enzyme)催化功能，我和實驗室的葉宇涵同學將 Ifc 上可能負責酵素催化功能之胺基酸序列突變，其中挑了三個可能的區域分別進行突變，依序稱為  $\Delta$ CAT 1、 $\Delta$ CAT 2、 $\Delta$ CAT 3，還有三個區域同時突變的  $\Delta$ CAT Total (之後依序簡稱為  $\Delta$ C1、 $\Delta$ C2、 $\Delta$ C3、 $\Delta$ CT)，如下所示：

Ifc, isoform A 胺基酸序列:

MGQKVSRTDFEWVYTEEPHASRRKIILEKYPQIKKLFGHDPNFKWVAGAMVLT  
QILALFVVKDLSWSWLIVAAYCFGGIINHSLMLAVHEISHNLAFGHSRPMHNRIL  
GFICNLPIGLPMSISFKKYHLEHHRYQGDEAIDTDIPTLLEARLFDTTFGKFLWVC  
LQPFFYIFRPLIINPKPPTREIINTVVQLTFNALIVYFLGWKPLAYLLIGSILAMGL  
HPVAGHFISEHYMFAKGFETYSYYGPLNWITFNVGYHNEHHDFAVPGSRLPEV  
KRIAKEFYDTMPQHTSWTRVLYDFIMDPAVGOPYARVKRRQRGLAS

**HxxxH** & **HxxHH**: catalytically essential histidine residues

將組胺酸(histidine, H)突變成丙胺酸(alanine, A)

探討 Ifc 的酵素活性是否會影響光依賴性神經退化之前，我們想先知道，這些



突變的 *ifc* 是否會影響果蠅生存，於是我和實驗室的葉宇涵同學、林志維學弟在果蠅全身性失去 *ifc* 的遺傳背景下，利用 *tub-Gal4* 在全身分別過表達這些突變的 *ifc*，以及野生型(wild type, WT)的 *ifc* 當作控制組，觀察突變的 *ifc* 是否能拯救全身性失去 *ifc* 果蠅的死亡，結果如下表所示：

	WT	$\Delta C1$	$\Delta C2$	$\Delta C3$	$\Delta CT$
<i>ifc</i> -KO,40A/CyO-GFP; UAS- <i>ifc</i> ( )-mCherry/ <i>tub-Gal4</i> <i>ifc</i> -KO/CyO; UAS- <i>ifc</i> ( )-mCherry/ <i>tub-Gal4</i>	203	356	591	324	540
<i>ifc</i> -KO,40A/CyO-GFP; UAS- <i>ifc</i> ( )-mCherry/TM6B	128	143	200	164	193
<i>ifc</i> -KO/CyO; UAS- <i>ifc</i> ( )-mCherry/TM6B	194	199	295	173	300
<i>ifc</i> -KO,40A/ <i>ifc</i> -KO; UAS- <i>ifc</i> ( )-mCherry/ <i>tub-Gal4</i>	250	0	0	0	0
Total	775	698	1086	661	1033

實驗結果顯示，果蠅全身性失去 *ifc* 的遺傳背景下，若利用 *tub-Gal4* 在全身過表達酵素催化功能突變的 *ifc* 皆無法成功拯救果蠅的死亡，代表這些可能負責酵素催化功能的區域對果蠅生存是重要的。

接下來我們進一步想知道這些區域突變的 *ifc* 是否會影響其減緩光依賴性神經退化的能力，利用 *eyFLP* 在果蠅眼睛產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞，同時以 *GMR-Gal4* 在眼睛過表達 *wRNAi* 當作控制組(*ifc*-KO)，並在此遺傳背景下利用 *GMR-Gal4* 在眼睛分別過表達 *ifc*(WT)-mCherry (*GMR>ifc*(WT)-mCherry) 或 *ifc*( $\Delta C3$ )-mCherry (*GMR>ifc*( $\Delta C3$ )-mCherry) 作為實驗組，在照光 10 天之後，以免疫螢光染色實驗確認其視神經細胞的形態，免疫螢光染色中以鬼筆環肽標定桿狀小體； $Na^+/K^+$  ATPase 標定神經細胞膜。*GMR>ifc*(WT)-mCherry 相較於 *ifc*-KO 的組別，其鬼筆環肽所標定的桿狀小體數目有顯著增加(Fig. 4A, B, D)，且在視神經電位紀錄中，其代表神經功能的去極化振幅也有顯著上升(Fig. 4E, F)，但若是 *GMR>ifc*( $\Delta C3$ )-mCherry 和 *GMR>ifc*(WT)-mCherry 的組別相比，其桿狀小體的數目則會顯著減少(Fig. 4B-D)，且在視神經電位紀錄中的去極化振幅也會顯著下降(Fig. 4E, F)，推論將 *Ifc* 上可能負責酵素催化功能之胺基酸序列突變，會降低 *Ifc*-mCherry 減緩光依賴性神經退化的能力。

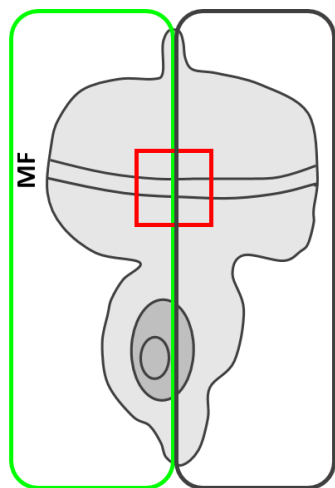


為了排除 *Ifc*(WT)-mCherry 和 *Ifc*( $\Delta$ C3)-mCherry 蛋白表現量不一致的可能性，我們利用 *nSyb*-GAL4 在神經細胞過表達 *ifc*(WT)-mCherry 或 *ifc*( $\Delta$ C3)-mCherry，萃取果蠅頭部的蛋白以西方墨點法(Western blot)比較兩者的蛋白含量(Supplementary Fig. 2A)，從實驗結果得知，*Ifc*(WT)-mCherry 和 *Ifc*( $\Delta$ C3)-mCherry 的蛋白表現量在統計上並無顯著差異(Supplementary Fig. 2B)。

### 3.5 過表達 *ifc*(WT)-mCherry 造成胞外 mCD63 puncta 數量增加，其調控可能與 *Ifc* 的酵素活性有關

先前實驗室的游宇蓮學姊觀察到 *Ifc* 會和胞外體(exosome)的標記(marker)在免疫螢光染色下共位(colocalize)，接下來我們想進一步知道 *ifc* 是否會調控胞外體的分泌。我們利用 *DE*-Gal4 (*Dorsal Eye*-Gal4)在果蠅幼蟲眼碟(eye disc)的背側(dorsal compartment)過表達 GFP-mCD63 來標定胞外體，同時分別過表達 mCherry-CAAX 當作控制組和 *ifc*(WT)-mCherry 作為實驗組，觀察過表達 *ifc*(WT)-mCherry 是否會增加胞外 mCD63 puncta 數量。

因為 *DE*-Gal4 表現位置只在眼碟背側，所以如果在 *DE*-Gal4 表現的另一側觀察到 GFP-mCD63 訊號，代表這些 mCD63 puncta 是從蛋白表現側分泌出來。另外，我們發現在眼碟的形態溝(morphogenetic furrow)中有比較多 GFP-mCD63 訊號，為了方便觀察，所以統一固定在形態溝拍攝免疫螢光染色圖。由於形態溝是沒有細胞的凹陷結構，所以使用染劑 DAPI 標定細胞核來確認形態溝位置。從實驗結果來看，過表達 *ifc*(WT)-mCherry 相較於過表達 mCherry-CAAX 的組別，在蛋白表現的另一側有更多 GFP-mCD63 訊號(Fig. 5A, B, D)，因此，我們推論過表達 *ifc*(WT)-mCherry 會造成胞外 mCD63 puncta 數量增加。



- 過表達蛋白的細胞  
(*DE-Gal4*表現的位置)
  - 未過表達蛋白的細胞
  - 共軛焦顯微鏡拍攝位置
- MF: morphogenetic furrow



圖一、*DE-Gal4* 在眼碟背側表現之示意圖

前人研究指出，神經醯胺(ceramide)含量增加會促進胞外體分泌[25][42]，而 *Ifc* 本身具有酵素催化功能，可以將二羥基神經醯胺(dihydroceramide)催化成神經醯胺，所以過表達 *ifc* 理論上會增加神經醯胺的含量，因此，我們想更進一步知道過表達 *ifc(WT)-mCherry* 造成胞外 mCD63 puncta 數量增加是否與 *Ifc* 本身的酵素活性有關。我們在上述實驗設置下多加一組過表達 *ifc(ΔC3)-mCherry* 的組別，觀察將 *Ifc* 上可能負責酵素催化功能之胺基酸序列突變，和過表達 *ifc(WT)-mCherry* 的組別相比，其胞外 mCD63 puncta 數量是否會有所改變。從實驗結果來看，過表達 *ifc(ΔC3)-mCherry* 和過表達 *ifc(WT)-mCherry* 的組別相比，其蛋白表現的另一側 GFP-mCD63 訊號會減少(Fig. 5B-D)，因此，我們推論過表達 *ifc(WT)-mCherry* 造成胞外 mCD63 puncta 數量增加，其調控可能與 *Ifc* 的酵素活性有關。

### 3.6 Hrs 蛋白突變(*Hrs*<sup>D28/+</sup>)使過表達 *ifc(WT)-mCherry* 所增加的胞外 mCD63 puncta 數量減少

根據前人研究，胞外體生合成之調控主要有 ESCRT 蛋白或神經醯胺參與的兩種理論[37][38]，由我們的實驗推論 *Ifc* 可能透過其酵素活性將二羥基神經醯胺催化成神經醯胺，進而使胞外 mCD63 puncta 數量增加。除了神經醯胺所參與的調控之外，ESCRT 蛋白也被認為是調控胞外體生合成的重要因子[39][40]，因此，我們

想進一步知道 *ifc* 調控胞外 mCD63 puncta 數量增加是否需要 ESCRT 蛋白一起參與調控。

ESCRT 蛋白可以細分成 4 個種類，分別為 ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III，我們從中挑了屬於 ESCRT-0 的 Hrs 蛋白和屬於 ESCRT-II 的 Vps25 蛋白進行實驗。有研究指出 Hrs 蛋白會調控樹突細胞(dendritic cell)的胞外體分泌[48]；在果蠅研究上，也有證據指出 Hrs 蛋白會調控胞內體(endosome)膜的內陷[49]；而 Vps25 被認為在多囊泡體(multivesicular body, MVB)形成腔內囊泡(intraluminal vesicle, ILV)的過程是重要的[50]。我們想知道在 ESCRT 蛋白突變(Hrs<sup>D28/+</sup>或 Vps25<sup>A3/+</sup>)的遺傳背景下，原本過表達 *ifc*(WT)-mCherry 所增加的胞外 mCD63 puncta 數量是否會受到影響。我們在不同的遺傳背景下，以 *DE*-Gal4 在果蠅幼蟲眼碟的背側細胞同時過表達 *ifc*(WT)-mCherry 和 GFP-mCD63，發現在 Hrs 蛋白突變(Hrs<sup>D28/+</sup>)的遺傳背景下(Fig. 6B-B''')，和控制組(Fig. 6A-A''')相比其胞外 mCD63 puncta 數量會下降(Fig. 6D)；而在 Vps25 蛋白突變(Vps25<sup>A3/+</sup>)的組別(Fig. 6C-C''')，其胞外 mCD63 puncta 數量和控制組(Fig. 6A-A''')相比則沒有顯著差異(Fig. 6D)，因此，我們認為 *Ifc* 可能和 Hrs 蛋白一起調控使胞外 mCD63 puncta 數量增加。

### 3.7 失去 *ifc* 減少胞外 mCD63 puncta 數量

既然過表達 *ifc*(WT)-mCherry 會造成胞外 mCD63 puncta 數量增加，我們也想知道，如果失去 *ifc* 是否會減少胞外 mCD63 puncta 數量。我們利用 *eyFLP* 在果蠅幼蟲眼碟產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞，同時以 *DE*-Gal4 在眼碟背側過表達 GFP-mCD63 來標定胞外體，觀察失去 *ifc* 的組別和控制組相比，是否會減少胞外 mCD63 puncta 數量。從實驗結果來看，*ifc*-KO 的組別和控制組相比，其在蛋白表現另一側的 GFP-mCD63 訊號會減少(Fig. 7A-C)，因此，我們推論失去 *ifc* 會減少胞外 mCD63 puncta 數量。



### 3.8 失去 *ifc* 造成多囊泡體中的腔內囊泡數量有減少趨勢

胞外體形成是一個連續的過程，研究胞外體分泌的調控通常會檢驗這個連續過程中的其中兩個步驟，分別是多囊泡體的生合成與多囊泡體和細胞膜結合的調控[51][52]。我們首先利用穿透式電子顯微鏡(transmission electron microscopy, TEM)觀察多囊泡體的生合成是否有受到影響，在照光3天的條件下，比較失去 *ifc* 的組別(Fig. 8A-I)和控制組(Fig. 8J-L)，其多囊泡體的大小和多囊泡體中腔內囊泡的數量是否有明顯差異。實驗結果顯示，*ifc*-KO 的組別和控制組相比，其多囊泡體的大小和多囊泡體中腔內囊泡的數量在統計上皆無顯著差異(Fig. 8M, N)，然而，*ifc*-KO 組別的多囊泡體中腔內囊泡數量和控制組相比有明顯減少的趨勢，推測可能是因為 *ifc*-KO 組別的樣本量(sample size)太小，所以才導致在統計上沒有達到顯著差異，因此，我們認為 *ifc* 可能會影響多囊泡體的生合成。

### 3.9 失去 *ifc* 造成多囊泡體生合成減少

我們觀察到失去 *ifc* 會減少胞外 mCD63 puncta 數量，且在電顯也看到多囊泡體中的腔內囊泡數量有減少趨勢，所以接著想進一步確認 *ifc* 是否的確是透過調控多囊泡體的生合成來影響胞外體數量。

為了知道 *ifc* 是否會調控多囊泡體的生合成，我們利用持續活化的 Rab5 (constitutively active Rab5, Rab5CA)以便觀察。一般來說，Rab5 被用來標定早期胞內體(early endosome)，但是因為持續活化的 Rab5 會形成比較大的胞內體(enlarged endosome)，同時具有早期胞內體和多囊泡體混合的形態，所以便於我們觀察多囊泡體的生合成[53][54][55]。我們利用 *eyFLP* 在果蠅眼睛產生 *ifc*-KO 同型合子的細胞，同時以 *rh1*-Gal4 在果蠅眼睛的視紫質(rhodopsin)過表達 GFP-mCD63 和 Rab5CA，藉由量化 GFP-mCD63 和 Rab5CA 訊號共位的面積相較於全部 Rab5CA 訊號面積的比例，代表多囊泡體生合成的程度。從實驗結果來看，*ifc*-KO 的組別(Fig. 9A-C)相較於控制組(Fig. 9D-F)，其量化的面積比例會下降(Fig. 9G)，因此，我們推論 *ifc*



會調控多囊泡體的生合成。

### 3.10 果蠅眼睛失去 *ifc* 和全身性失去 Rab4 造成的光依賴性神經退化屬於累加效應

Rab4 是一種會和鳥甘三磷酸(guanosine triphosphate; GTP)結合的 GTP 酶 (GTPase)。Rab4 主要被認為參與早期胞內體回到細胞膜的快循環(fast recycling)調控[56][57]，但有研究指出 Rab4 會在網狀紅血球(reticulocyte)成熟時，和釋放的胞外體結合[58]；也有研究指出細胞外的 Wg (Wingless)會和 Rab4 共位 [59]，因此我們把 Rab4 當成可能的胞外體標記。實驗室的游宇蓮學姊也觀察到 *Ifc* 會和 Rab4 在細胞外共位，於是我們接下來想知道 *ifc* 執行功能時是否需要 Rab4 協助。

首先，我們在 *ifc*-KO 的遺傳背景下將 Rab4 剔除，在照光 10 天之後的視神經電位紀錄中，*ifc*-KO+Rab4KO 和 *ifc*-KO 的組別相比，其代表神經功能的去極化振幅有顯著下降。因為只有將 Rab4 剔除的組別在照光 10 天之後也有神經功能退化的情況，所以需考慮和野生型  $w^{1118}$  組別比較，Rab4KO 和 *ifc*-KO 相較於  $w^{1118}$  所減少去極化比例的合，約等於 *ifc*-KO+Rab4KO 相較於  $w^{1118}$  所減少去極化比例(Fig. 10A, B)，因此，我們推論果蠅眼睛失去 *ifc* 和全身性失去 Rab4 造成的光依賴性神經退化屬於累加效應(additive effect)。

### 3.11 *ifc* 和 Rab4 對光依賴性神經退化的調控具有互補特性

*ifc*-KO 和 Rab4KO 造成的光依賴性神經退化屬於累加效應，從這個實驗結果來看，我們傾向認為 *ifc* 和 Rab4 對光依賴性神經退化的調控屬於兩條獨立 (independent)的調控路徑。為了進一步釐清 *ifc* 和 Rab4 對光依賴性神經退化的調控是否具有上下游關係，我們利用具有 Gal4 活性的 Rab4KO 來過表達 *ifc*(WT)-mCherry，若 *ifc* 為 Rab4 的下游，過表達 *ifc*(WT)-mCherry 則可以減緩 Rab4KO 造成的神經退化。在照光 10 天之後的視神經電位紀錄中，Rab4KO>*ifc*(WT)-mCherry



和 Rab4KO 相比，其代表神經功能的去極化振幅有顯著上升(Fig. 11C, D)，若只從這個實驗結果來看，推論 *ifc* 可能是 Rab4 的下游。但另一方面，我們也在 *ifc*-KO 的遺傳背景下，利用 GMR-Gal4 在眼睛過表達 YFP-Rab4，若 *ifc* 為 Rab4 的上游，過表達 YFP-Rab4 則可以減緩 *ifc*-KO 造成的神經退化。在照光 10 天之後的視神經電位紀錄中，*ifc*-KO + GMR>YFP-Rab4 和 *ifc*-KO 相比，其代表神經功能的去極化振幅有顯著上升(Fig. 11E, F)，若只從這個實驗結果來看，推論 *ifc* 可能是 Rab4 的上游。綜合上述兩個實驗的結果，我們認為 *ifc* 和 Rab4 對光依賴性神經退化的調控屬於兩條獨立的調控路徑且具有互補(complementary)特性。



# 第四章

## 實驗討論

#### 4.1 在視神經或神經膠細胞中失去 *ifc* 對光依賴性神經退化的影響

利用 *ey3.5-FLP* 在視神經將 *ifc* 剔除，造成視神經在形態和功能上皆出現光依賴性神經退化；而如果用 *repo-FLP* 在神經膠細胞將 *ifc* 剔除，只會看到視神經在功能上出現比較明顯的光依賴性神經退化，因此我們推測 *Ifc* 主要還是在神經中作用以維持神經功能。若是利用 *eyFLP* 在整個眼睛將 *ifc* 剔除，同時以 *repo-ifc-mCherry* 於神經膠細胞中表現 *ifc-mCherry* 可以減緩光依賴性神經退化，所以我們推測如果連神經都失去 *ifc* 的情況下，這時候神經膠細胞中的 *Ifc* 就扮演維持神經功能的重要角色。神經膠細胞中的 *Ifc* 如何協助神經維持其功能，我們認為有三種可能的調控方式：(1) *Ifc* 蛋白本身從神經膠細胞移動到神經以供應神經所需的 *Ifc* 蛋白，(2) 神經膠細胞將神經脂質代謝，代謝後的產物送回神經以補充神經需要的神經脂質，(3) 神經將過多的神經脂質送到神經膠細胞，由神經膠細胞協助這些神經脂質的代謝。

#### 4.2 *Ifc(ΔCAT)-mCherry* 是否真的破壞其酵素活性

我們總共製作 4 株 *UAS-ifc(ΔCAT)-mCherry* 果蠅( $\Delta C1\sim 3, \Delta CT$ )，但我們只挑 *ifc(ΔC3)-mCherry* 測試其對光依賴性神經退化的影響，因為 *Ifc(ΔC3)-mCherry* 相較於其它 *Ifc(ΔCAT)-mCherry*，其蛋白表現量最接近 *Ifc(WT)-mCherry*。除了本篇論文使用的 *ifc(ΔC3 #A)-mCherry*，我們也測試了其它 independent line，例如 *ifc(ΔC3 #B)-mCherry*，從西方墨點法的結果來看，我們認為可以排除 *Ifc(WT)-mCherry* 和 *Ifc(ΔC3)-mCherry* 蛋白表現量不一致的可能性(Supplementary Fig. 2)。

而過表達 *ifc(ΔC3)-mCherry* 相較於 *ifc(WT)-mCherry* 對光依賴性神經退化或胞外體分泌影響的實驗，我們只能推論實驗得到的結果可能是因為負責酵素催化功能的區域被破壞所導致，但是並無法直接說明是因為二羥基神經醯胺或神經醯胺含量改變的關係，因此我們必須進一步檢驗 *Ifc(ΔC3)-mCherry* 是否會改變二羥基神經醯胺和神經醯胺的比例。利用 *DE-Gal4* 過表達 *ifc(WT)-mCherry* 或 *ifc(ΔC3)-*





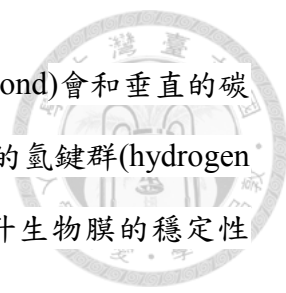
mCherry，並以 anti-Ceramide 標定神經醯胺，比較兩者神經醯胺的含量是否有明顯差異，從此實驗結果可能可以得知 Ifc( $\Delta$ C3)-mCherry 的酵素活性是否的確有被破壞。

#### 4.3 胞外體標記選擇

一般胞外體的研究會用兩種以上的標記來標定胞外體，常見的胞外體標記包含 CD9、CD63、CD81、Alix、flotillin-1 等。我們的實驗中只有使用 CD63 這一種胞外體標記，雖然 CD63 是最常見的胞外體標記之一，但若只使用一種胞外體標記可能不足以說明所被標定的囊泡就是胞外體。儘管有這方面的考量，但在實際的實驗操作上卻有其困難。我們的實驗材料為果蠅的組織而非細胞，在果蠅的實驗中，若要過表達某種蛋白，最常見的方法為 Gal4-UAS 系統，利用 Gal4 在特定組織上過表達 UAS 序列後所接的蛋白。在 *DE*-Gal4 的眼碟實驗中，需要過表達可以作為胞外體標記的蛋白，且還需要藉由一、二抗來放大螢光訊號以利觀察胞外的 puncta。就現有果蠅中心(Bloomington Drosophila Stock Center)所提供的果蠅和其它果蠅實驗室，除了 CD63 之外並無上述提到的其它胞外體標記之 UAS 果蠅，因此，若要解決此問題，可能必須自行製作帶有胞外體標記蛋白的 UAS 果蠅。

#### 4.4 脂質組成對胞外體的影響

Ifc 可以將二羥基神經醯胺催化成神經醯胺，而二羥基神經醯胺和神經醯胺兩者間的比例(dihydroceramide:ceramide ratio)會影響生物膜(biological membrane)的特性，例如有研究指出若增加此比例會使溶酶體膜的通透性(permeabilization)增加 [60]。然而，如果單從二羥基神經醯胺和神經醯胺這兩種脂質的特性去分析：Hernández-Tiedra 等人提出二羥基神經醯胺會使生物膜較不穩定，他們發現含 16 碳二羥基神經醯胺的巨大單層膜囊泡(C16 dihydroceramide-containing GUV)，其膜會呈現局部比較硬(rigid)的不均勻(inhomogeneous)特性[60]；Löfgren 和 Pascher 等人



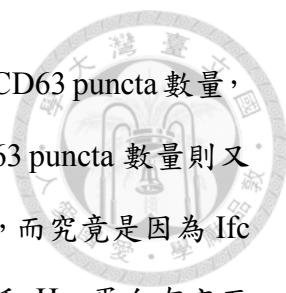
發現神經醯胺在 4 號和 5 號碳之間的反式雙鍵(4,5-trans-double bond)會和垂直的碳鏈形成密集(close-packed)的排列[61]；Pascher 也指出神經醯胺的氫鍵群(hydrogen bonding group)有利神經醯胺於生物膜中形成側邊的氫鍵以提升生物膜的穩定性[62]。

根據上述提到的二羥基神經醯胺和神經醯胺之特性，我們推測胞外體膜上的脂質組成若是含有較高比例的神經醯胺，能使胞外體膜有較好的穩定性，可能有利胞外體進行較長遠距離的運輸。

#### 4.5 Ifc 可能和 ESCRT 蛋白一起調控胞外體分泌

先前對胞外體生合成調控的研究主要認為有 ESCRT 蛋白或神經醯胺參與的兩種調控[37][38]。ESCRT 蛋白被認為是調控胞外體生合成的重要因子[39][40]；但有研究指出從 4 種 ESCRT 蛋白(ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III)中分別挑選 1 個代表性的蛋白(Hrs、Tsg101、Vps22、Vps24)，同時將此 4 個蛋白以 siRNA 減量，結果仍然可以觀察到胞外體的生合成，因而提出可能存在不需要 ESCRT 蛋白參與的胞外體生合成機制[63]；另外也有研究提出只要調控神經醯胺的含量來改變膜的特性就能影響胞外體的生合成[25][41][42]。

雖然胞外體的生合成常常被二分為 ESCRT-dependent 或 ESCRT-independent (也稱為 ceramide mechanism)兩種機制的其中一種[64]，但這兩種機制的調控可能不完全是獨立的，反而可能協同(synergize)一起作用。ESCRT-independent 機制提出神經醯胺會使膜彎曲以形成囊泡，但除了會自分選(self-assorting)到膜上特定脂質微區域(lipid microdomain)的物質之外，此特性並不具有分選(cargo sorting)的功能，這似乎暗示可能為 ESCRT 蛋白協助分選加上神經醯胺調控膜的彎曲，兩種機制協同以形成包覆特定物質的小囊泡[65]。此外，在 ESCRT-independent 機制的相關研究中，純化多種類型細胞分泌的胞外體並分析其蛋白組成，仍然含有 TSG101 和 ALIX 等 ESCRT 蛋白或是泛蛋白化(ubiquitinated)的蛋白[66][67]。



我們的實驗結果看到過表達 *ifc*(WT)-mCherry 會增加胞外 mCD63 puncta 數量，但是在 Hrs 蛋白突變(Hrs<sup>D28/+</sup>)的遺傳背景之下，胞外 mCD63 puncta 數量則又會減少，代表 Ifc 可能和 Hrs 蛋白一起參與胞外體生合成的調控，而究竟是因為 Ifc 改變神經醯胺的含量加上 Hrs 蛋白一起作用，還是 Ifc 蛋白本身和 Hrs 蛋白有交互作用進而調控胞外體的生合成則需要進一步釐清。然而，我們使用的突變 ESCRT 蛋白(Hrs<sup>D28/+</sup>或 Vps25<sup>A3/+</sup>)為異型合子(heterozygote)，因為在同型合子(homozygote)的遺傳背景下果蠅無法存活，若要使實驗結果更有說服力，可以利用 ESCRT 蛋白的 RNAi 果蠅以減少 ESCRT 蛋白表現量進行實驗，比較其結果是否和異型合子的突變 ESCRT 蛋白實驗一致。

#### 4.6 *ifc* 和 Rab4 互補調控在生理上的意義

不管在 Rab4KO 遺傳背景下過表達 *ifc*(WT)-mCherry 或在 *ifc*-KO 遺傳背景下過表達 YFP-Rab4，都可以減緩原本的光依賴性神經退化，因此，我們推論 *ifc* 和 Rab4 對光依賴性神經退化之調控屬於兩條獨立的調控路徑且具有互補特性。我們試著從生理功能探討此現象，提出一個可能的解釋方法，細胞為了維持正常功能，會將細胞中沒有用處或是有害的物質清除，而清除廢物的方式除了可以利用溶酶體(lysosome)將物質分解之外，細胞還能以胞外體的形式將廢物送出細胞外以減少對自身的傷害[26][27]。我們認為 *ifc* 可以調控胞外體分泌以清除廢物；而 Rab4 已被熟知的功能為調控早期胞內體回到細胞膜的快循環[56][57]，我們推測 Rab4 可以藉由調控快循環來將廢物送出細胞外。基於上述，我們認為 *ifc* 和 Rab4 這兩種可能將廢物送出細胞外的途徑，當其中一條被阻斷，可以透過加強另一條路徑協助細胞將廢物排出，因而維持細胞正常功能。



# 第五章

## 未來實驗方向




## 5.1 探討 Ifc 和 ESCRT 蛋白一起調控胞外體分泌的可能機制

雖然我們認為可能是 Ifc 改變神經醯胺含量加上 Hrs 蛋白一起作用來調控胞外體生合成，但目前並沒有直接的證據支持此說法，而且也無法排除 Ifc 蛋白本身和 Hrs 蛋白有交互作用進而調控胞外體生合成的可能。為了解決在活體內(*in vivo*)實驗的困境，我們可以在活體外(*in vitro*)進行實驗以提供更直接的證據，有研究指出以人工的(*artificial*)方式合成巨大單層膜囊泡(*giant unilamellar vesicle*, GUV)，在加入純化後的 Vps20 和 Snf7 兩種 ESCRT-III 蛋白，可以使膜內陷形成類似腔內囊泡的構造，因為 Snf7 可以藉由 Vps20 在膜上進行成核(*nucleation*)以形成螺旋的絲狀結構(*spiral filament*)，而此結構可以協助膜向內凹陷形成腔內囊泡[68]。若我們能成功建立此系統，就能進行不同的實驗操作，例如：(1)直接改變膜上的神經醯胺比例，觀察是否會影響膜的內陷，(2)只加入 Ifc 觀察是否能看到膜的內陷，若可以的話，(3)同時加入 Ifc 和二羥基神經醯胺，是否能觀察到更多的腔內囊泡，若 Ifc 主要透過調控神經醯胺含量來促進胞外體生合成，在此操作下有更多二羥基神經醯胺能被 Ifc 催化成神經醯胺，則應該看到更多腔內囊泡。

## 5.2 探討 *DEGS1*-KO 細胞分泌的胞外體數量和組成

根據實驗室之前的研究，在 *ifc*-KO 的遺傳背景下，觀察到細胞的自噬作用(*autophagy*)活化，我們推測自噬作用活化可能會抑制胞外體分泌，加上先前實驗室利用 SH-SY5Y 細胞(一種人類神經母細胞瘤的細胞株)檢驗 *DEGS1* 的調控和功能在演化上具有高度保守性[2]。因此，我們希望建立 *DEGS1*-KO 細胞，藉由細胞培養的方式，可以收集培養基(*culture medium*)後以超高速離心的方式純化大量胞外體，如此一來就能分析失去 *DEGS1* 是否會減少胞外體的數量，並且還能以 *ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (UHPLC-MS/MS) 分析胞外體的神經脂質組成。

### 5.3 探討失去 Rab4 是否會增加胞外體分泌

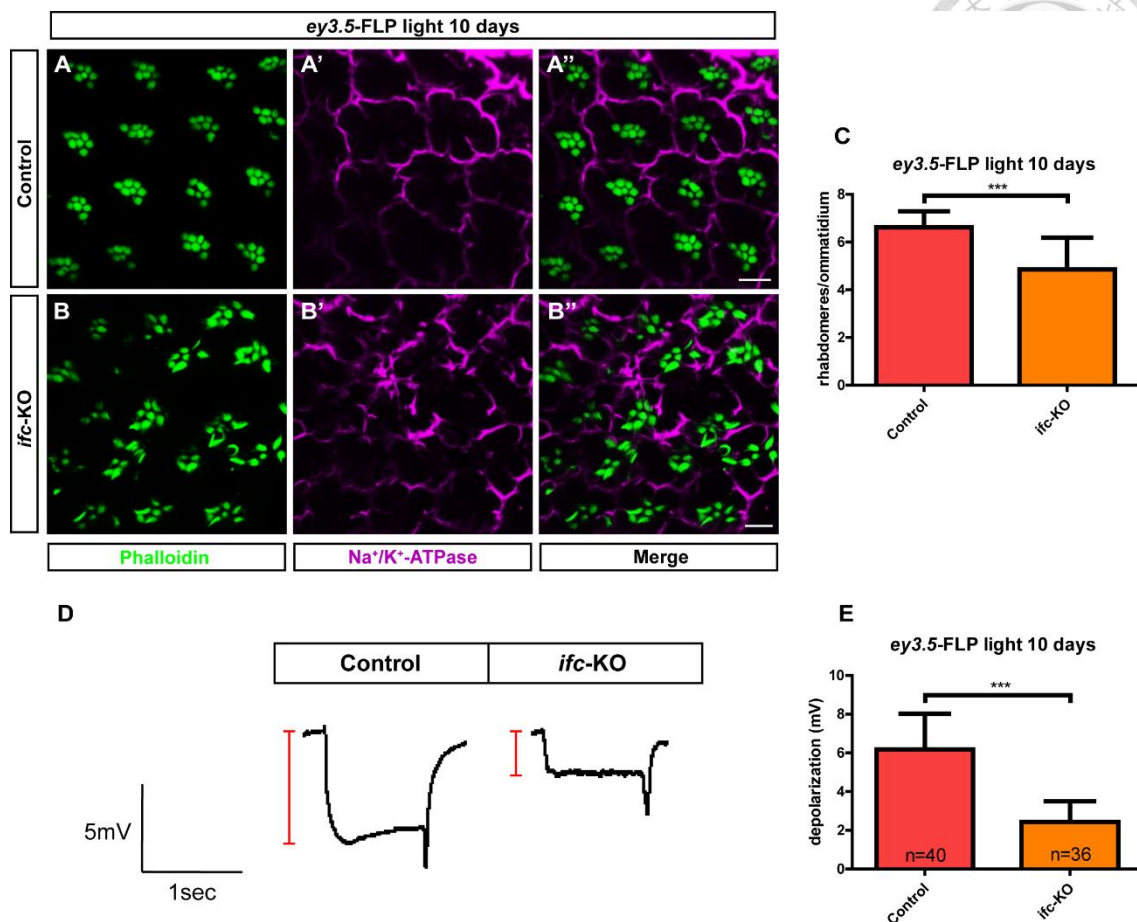


關於 *ifc* 和 Rab4 互補調控在生理上的意義，我們提出了一個可能的解釋：*ifc* 和 Rab4 這兩種將廢物送出細胞外的可能途徑，當其中一條被阻斷，可以透過加強另一條路徑以協助細胞將廢物排出，因而維持細胞功能。為了提升這個說法的可信度，我們可以在 Rab4KO 的遺傳背景下，利用 *DE-Gal4* 在果蠅幼蟲眼碟的背側同時過表達 GFP-mCD63 (標定胞外體)和 *ifc*(WT)-mCherry，觀察胞外 mCD63 puncta 數量是否會增加，若符合我們提的假說，在 Rab4KO 的遺傳背景下，因為 Rab4 調控的快循環清除路徑被阻斷，所以會增強 *ifc* 促進胞外體分泌的路徑來協助清除廢物，因此應該觀察到更多胞外 mCD63 puncta。



# 第六章

## 實驗圖表



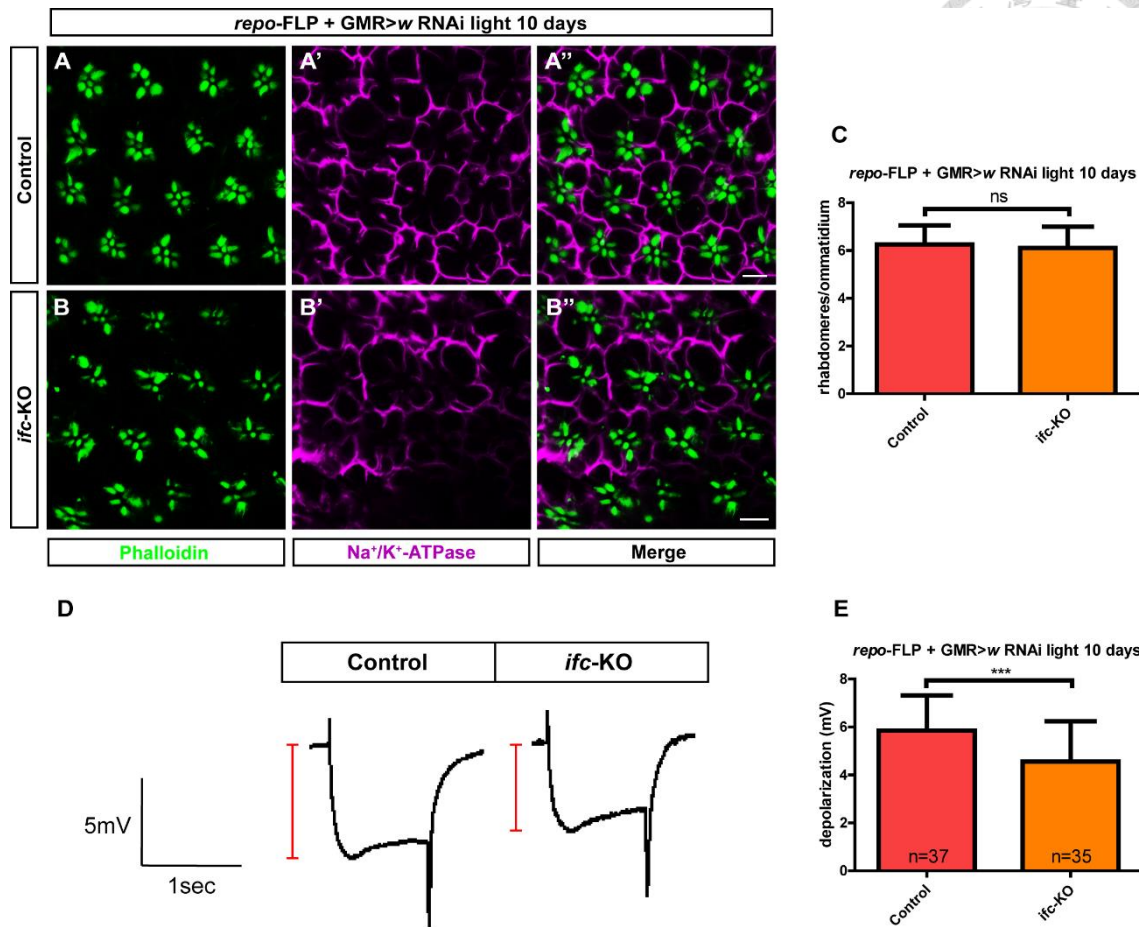
**Fig. 1** 剔除視神經細胞中的 *ifc* 造成視神經在形態和功能上的光依賴性神經退化

(A-C) 控制組(A-A'')和以 *ey3.5-FLP* 在視神經產生 *ifc-KO* 同型合子細胞的組別(B-B'')照光 10 天後的果蠅眼睛橫切圖，以兔筆環肽(綠色)標定桿狀小體，以  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase(紫紅色)標定神經細胞膜，比例尺：5  $\mu\text{m}$ ；每個小眼(ommatidium)中的桿狀小體數目量化在(C) (每一組別 = 3 隻果蠅，每一隻果蠅  $\geq 16$  個小眼)。

(D, E) 控制組和 *ifc-KO* 組別的視神經電位紀錄比較，照光 10 天後 *ifc-KO* 組別相較於控制組在去極化的振幅有顯著變小。視神經電位紀錄的 trace 在(D)；去極化的振幅量化在(E)。

量化圖資訊:(C, E)以平均值  $\pm$  標準差呈現;\*\*\*代表  $P < 0.001$  (Student's t-test)。



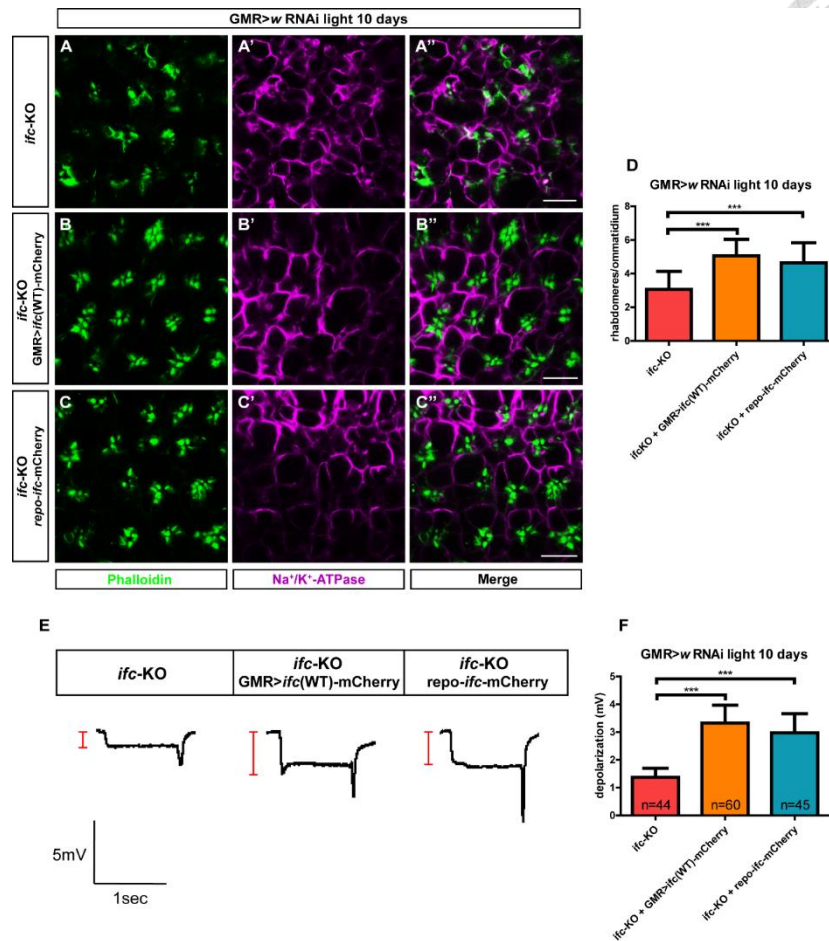
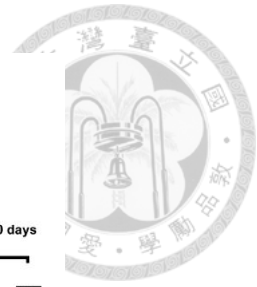


**Fig. 2** 剔除神經膠細胞中的 *ifc* 造成視神經在功能上出現光依賴性神經退化

(A-C) 控制組(A-A'')和以 *repo-FLP* 在神經膠細胞產生 *ifc-KO* 同型合子細胞的組別(B-B'')照光 10 天後的果蠅眼睛橫切圖，以鬼筆環肽(綠色)標定桿狀小體，以  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase(紫紅色)標定神經細胞膜，比例尺：5  $\mu\text{m}$ ；每個小眼中的桿狀小體數目量化在(C)(每一組別 = 3 隻果蠅，每一隻果蠅  $\geq$  16 個小眼)。

(D, E) 控制組和 *ifc-KO* 組別的視神經電位紀錄比較，照光 10 天後 *ifc-KO* 組別相較於控制組在去極化的振幅有顯著變小。視神經電位紀錄的 trace 在(D)；去極化的振幅量化在(E)。

量化圖資訊:(C, E)以平均值  $\pm$  標準差呈現;\*\*\*代表  $P < 0.001$  (Student's t-test)。

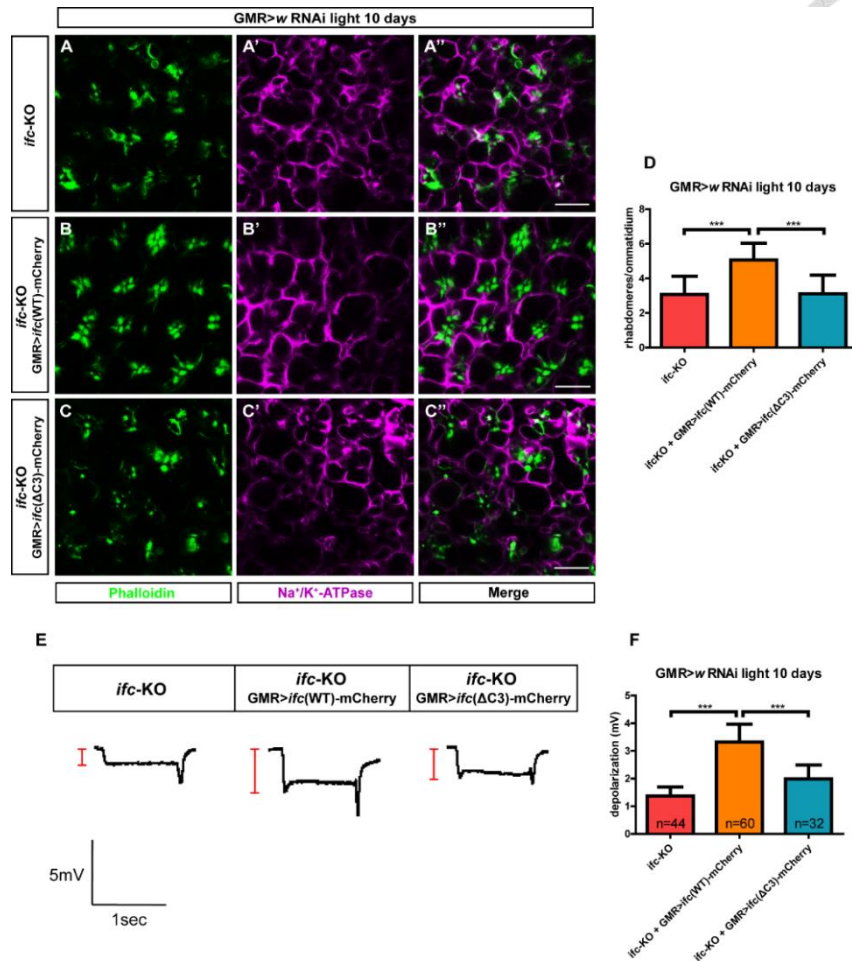


**Fig. 3 在神經膠細胞中表現 *ifc-mCherry* 減緩果蠅眼睛失去 *ifc* 造成之光依賴性神經退化**

(A-D) 以 *eyFLP* 在眼睛產生 *ifc-KO* 同型合子細胞(A-A'')和 *ifc-KO* 遺傳背景下以 *GMR-Gal4* 在眼睛過表達 *ifc(WT)-mCherry* (B-B'')或以 *repo* 啟動子在神經膠細胞表現 *ifc-mCherry* (C-C'')照光 10 天後的果蠅眼睛橫切圖，以鬼筆環肽(綠色)標定桿狀小體，以  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase(紫紅色)標定神經細胞膜，比例尺：10  $\mu\text{m}$ ；每個小眼中的桿狀小體數目量化在(D) (每一組別 = 3 隻果蠅，每一隻果蠅  $\geq$  16 個小眼)。

(E, F) *ifc-KO* 遺傳背景和此遺傳背景下加上 *GMR>ifc(WT)-mCherry* 或 *repo-ifc-mCherry* 的視神經電位紀錄比較，照光 10 天後 *repo-ifc-mCherry* 組別的去極化振幅恢復到接近 *GMR>ifc(WT)-mCherry* 的組別。視神經電位紀錄的 trace 在(E)；去極化的振幅量化在(F)。

量化圖資訊:(D, F)以平均值  $\pm$  標準差呈現;\*\*\*代表  $P < 0.001$  (1way ANOVA)。

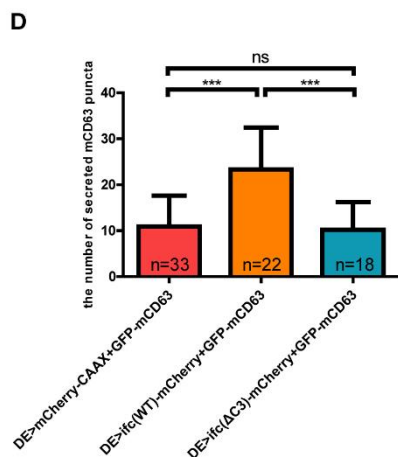
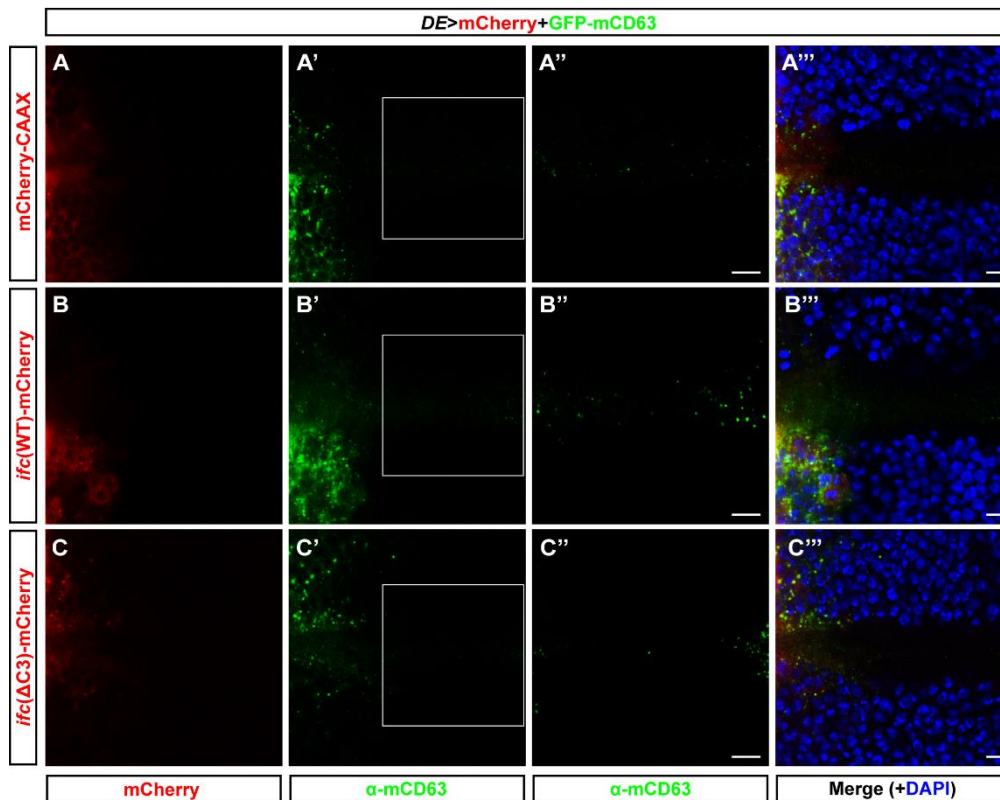
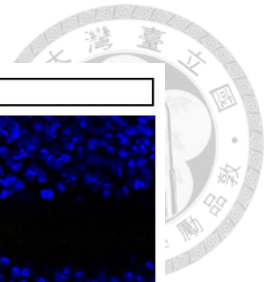


**Fig. 4** 突變 *Ifc* 上可能負責酵素催化功能之胺基酸序列降低 *Ifc-mCherry* 減緩光依賴性神經退化的能力

(A-D) 以 *eyFLP* 在眼睛產生 *ifc-KO* 同型合子細胞(A-A'')和 *ifc-KO* 遺傳背景下以 *GMR-Gal4* 在眼睛過表達 *ifc(WT)-mCherry* (B-B'')或 *ifc(ΔC3)-mCherry* (C-C'')照光 10 天後的果蠅眼睛橫切圖，以鬼筆環肽(綠色)標定桿狀小體，以  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (紫紅色)標定神經細胞膜，比例尺：10  $\mu\text{m}$ ；每個小眼中的桿狀小體數目量化在(D)(每一組別 = 3 隻果蠅，每一隻果蠅  $\geq$  16 個小眼)。

(E, F) *ifc-KO* 遺傳背景和此遺傳背景下加上 *GMR>ifc(WT)-mCherry* 或 *GMR>ifc(ΔC3)-mCherry* 的視神經電位紀錄比較，照光 10 天後 *GMR>ifc(ΔC3)-mCherry* 組別相較於 *GMR>ifc(WT)-mCherry* 的組別在去極化的振幅有顯著變小。視神經電位紀錄的 trace 在(E)；去極化的振幅量化在(F)。

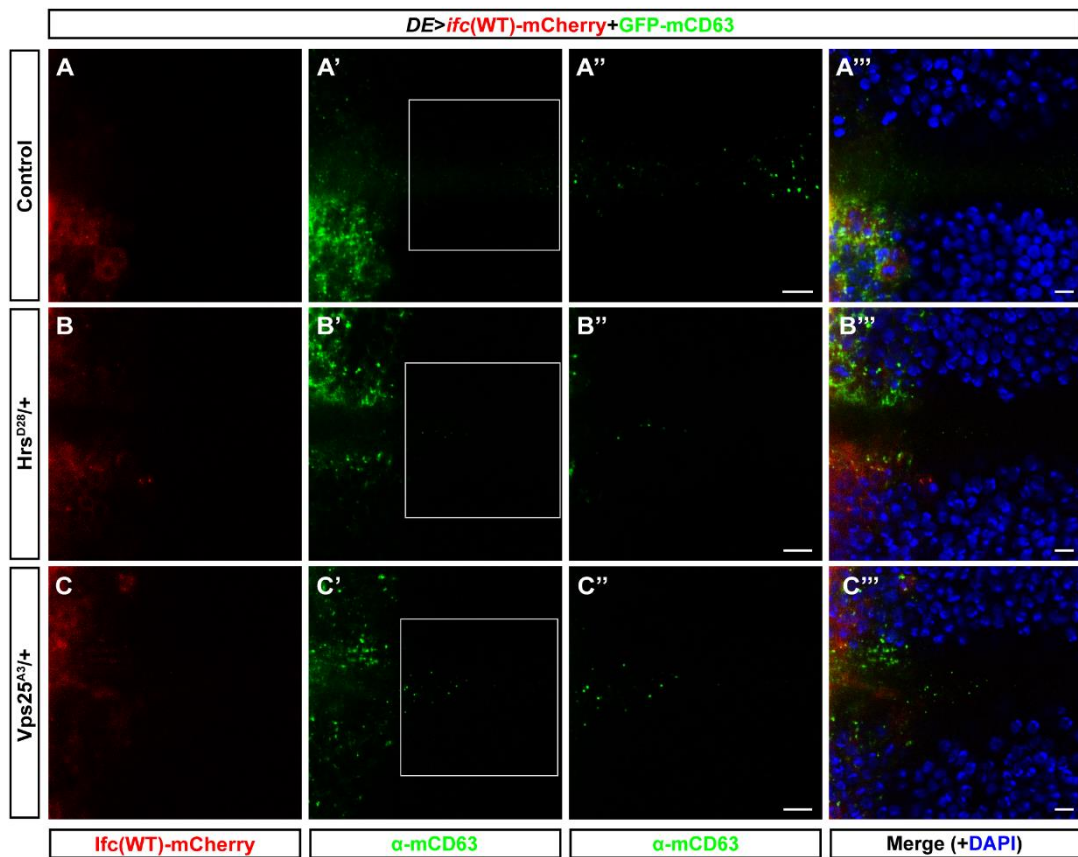
量化圖資訊:(D, F)以平均值  $\pm$  標準差呈現;\*\*\*代表  $P < 0.001$  (1way ANOVA)。



**Fig. 5 過表達 *ifc*(WT)-mCherry 造成胞外 mCD63 puncta 數量增加，其調控可能與 *Ifc* 的酵素活性有關**

(A-D) 以 *DE*-Gal4 在果蠅幼蟲眼碟的背側細胞同時過表達 GFP-mCD63 和 mCherry-CAAX (A-A'') 或 *ifc*(WT)-mCherry (B-B'') 或 *ifc*(ΔC3)-mCherry (C-C'')，以 mCD63(綠色)標定胞外體，以 DAPI(藍色)標定細胞核，比例尺：5 μm；胞外 mCD63 puncta 數目量化在(D)。

量化圖資訊：(D)以平均值 ± 標準差呈現；\*\*\*代表 P < 0.001 (1way ANOVA)。



D

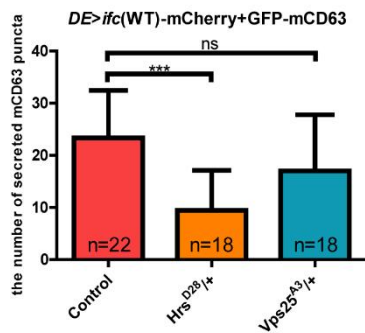
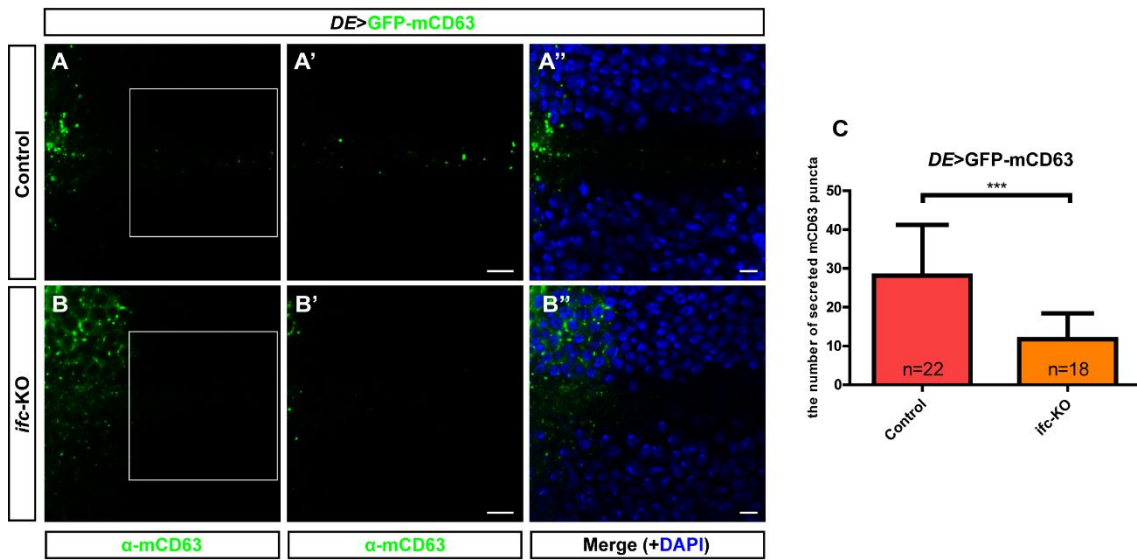


Fig. 6 Hrs 蛋白突變(Hrs<sup>D28/+</sup>)使過表達 *ifc*(WT)-mCherry 所增加的胞外 mCD63 puncta 數量減少

(A-D) 分別在野生型(A-A''')或 Hrs<sup>D28/+</sup>(B-B''')或 Vps25<sup>A3/+</sup>(C-C''')的遺傳背景下，以 *DE*-Gal4 在果蠅幼蟲眼碟的背側細胞同時過表達 *ifc*(WT)-mCherry 和 GFP-mCD63，以 mCD63(綠色)標定胞外體，以 DAPI(藍色)標定細胞核，比例尺：5 μm；胞外 mCD63 puncta 數目量化在(D)。

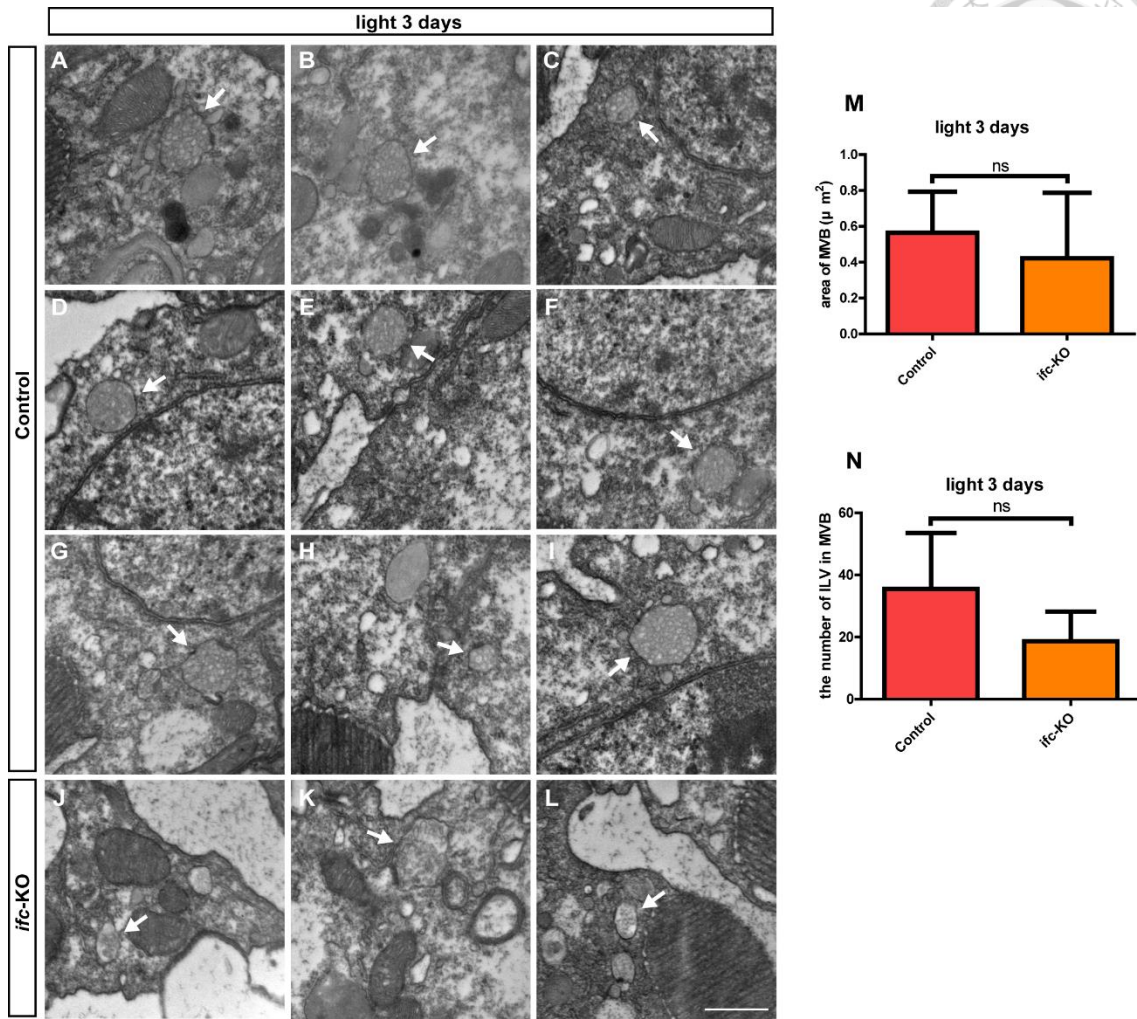
量化圖資訊：(D)以平均值 ± 標準差呈現；\*\*\*代表 P < 0.001 (1way ANOVA)。



**Fig. 7** 失去 *ifc* 減少胞外 mCD63 puncta 數量

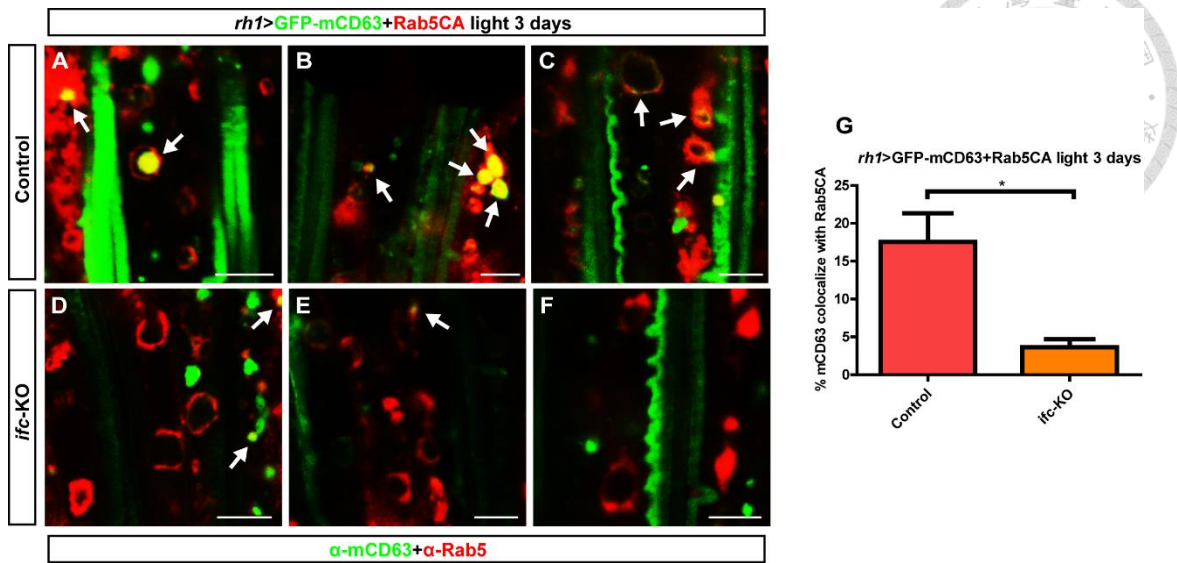
(A-C) 分別在野生型(A-A'')或 *ifc*-KO (B-B'')的遺傳背景下，以 *DE*-Gal4 在果蠅幼蟲眼碟的背側細胞過表達 GFP-mCD63，以 mCD63(綠色)標定胞外體，以 DAPI(藍色)標定細胞核，比例尺：5  $\mu$ m；胞外 mCD63 puncta 數目量化在(C)。

量化圖資訊：(D)以平均值  $\pm$  標準差呈現；\*\*\*代表  $P < 0.001$  (1way ANOVA)。



**Fig. 8** 失去 *ifc* 造成多囊泡體中的腔內囊泡數量有減少趨勢

(A-N) 控制組(A-I)和以 *eyFLP* 在果蠅眼睛產生 *ifc*-KO 同型合子細胞的組別(J-L)照光 3 天後的穿透式電子顯微鏡圖，比例尺：0.5 μm。多囊泡體的大小以面積量化在 (M)；多囊泡體中腔內囊泡的數量量化在(N) (控制組 n = 9, *ifc*-KO 組別 n = 3)。量化圖資訊：(M, N)以平均值 ± 標準差呈現；ns 代表無顯著差異(Student's t-test)。

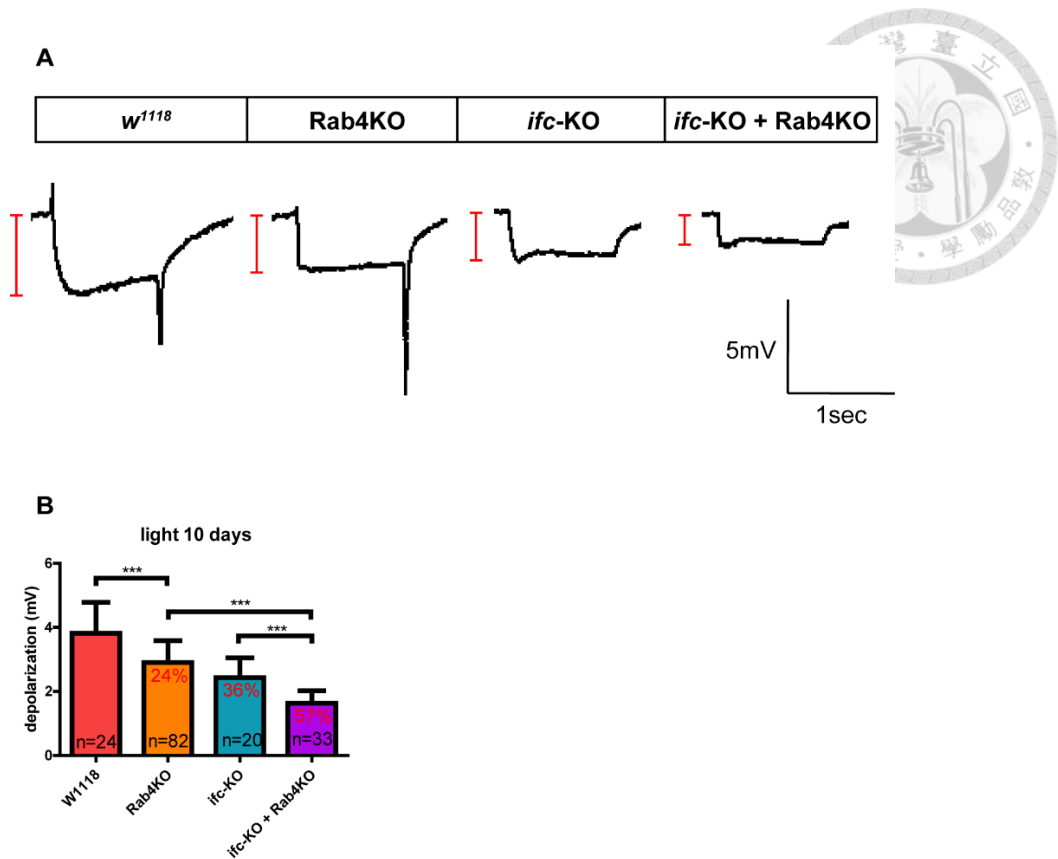


**Fig. 9** 失去 *ifc* 造成多囊泡體生合成減少

(A-G) 以 *rh1*-Gal4 在果蠅眼睛的視紫質過表達 GFP-mCD63 和 Rab5CA，比較控制組(A-C)和 *ifc*-KO 組別(D-F) GFP-mCD63 和 Rab5CA 訊號共位的面積相較於全部 Rab5CA 訊號面積的比例，來代表多囊泡體生合成的程度，以 mCD63(綠色)標定胞外體，以 Rab5CA(紅色)標定早期胞內體和多囊泡體混合，比例尺：5 μm；面積比值量化在(G)。

量化圖資訊：(G)以平均值 ± 標準差呈現；\*代表 P < 0.05 (Student's t-test)。

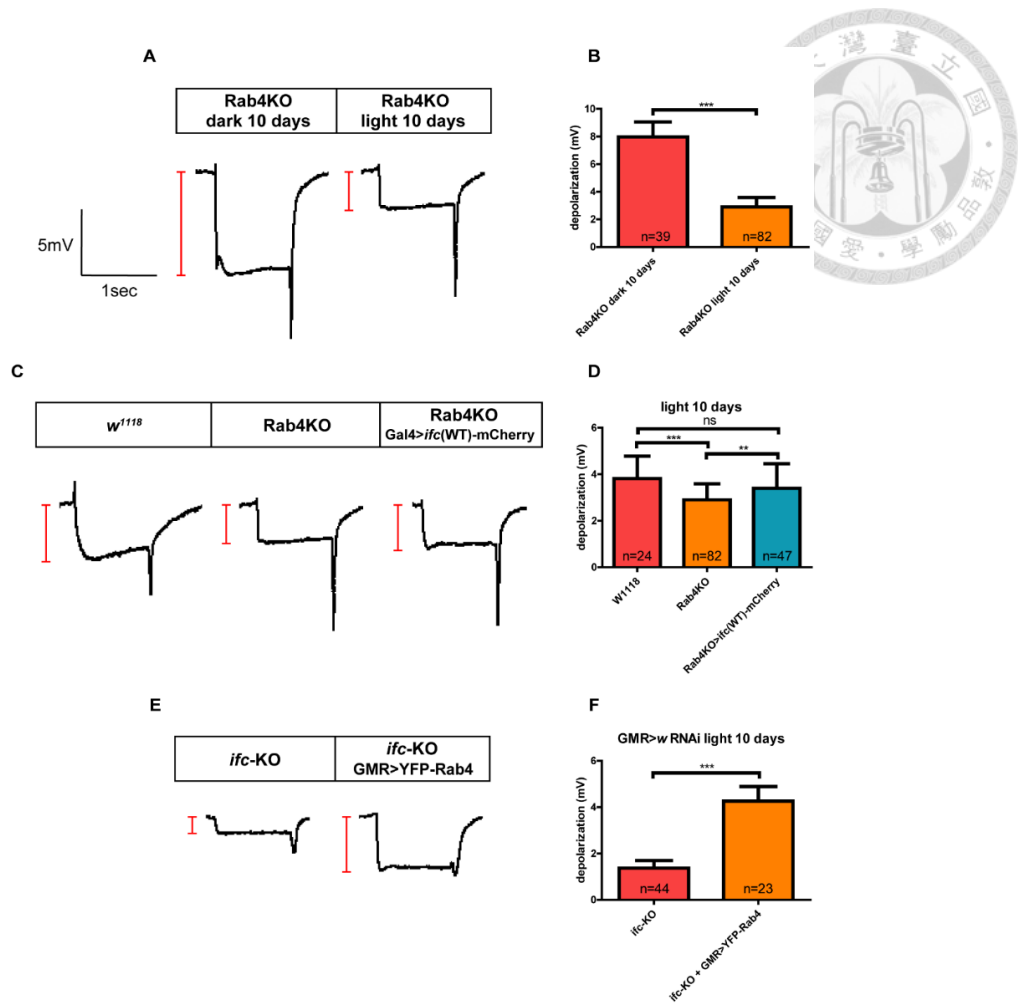




**Fig. 10** 果蠅眼睛失去 *ifc* 和全身性失去 Rab4 造成的光依賴性神經退化屬於累加效應

(A-B) *w<sup>1118</sup>*、Rab4KO、*ifc*-KO、*ifc*-KO+Rab4KO 的視神經電位紀錄比較，照光 10 天後 Rab4KO 和 *ifc*-KO 組別相較於 *w<sup>1118</sup>* 的組別在去極化的振幅皆有顯著變小，且兩者和 *w<sup>1118</sup>* 組別相比下降的比例約等於 *ifc*-KO+Rab4KO 和 *w<sup>1118</sup>* 組別相比下降的比例。視神經電位紀錄的 trace 在(A)；去極化的振幅量化在(B)。

量化圖資訊：(B)以平均值 ± 標準差呈現；\*\*\*代表 P < 0.001 (1way ANOVA)。



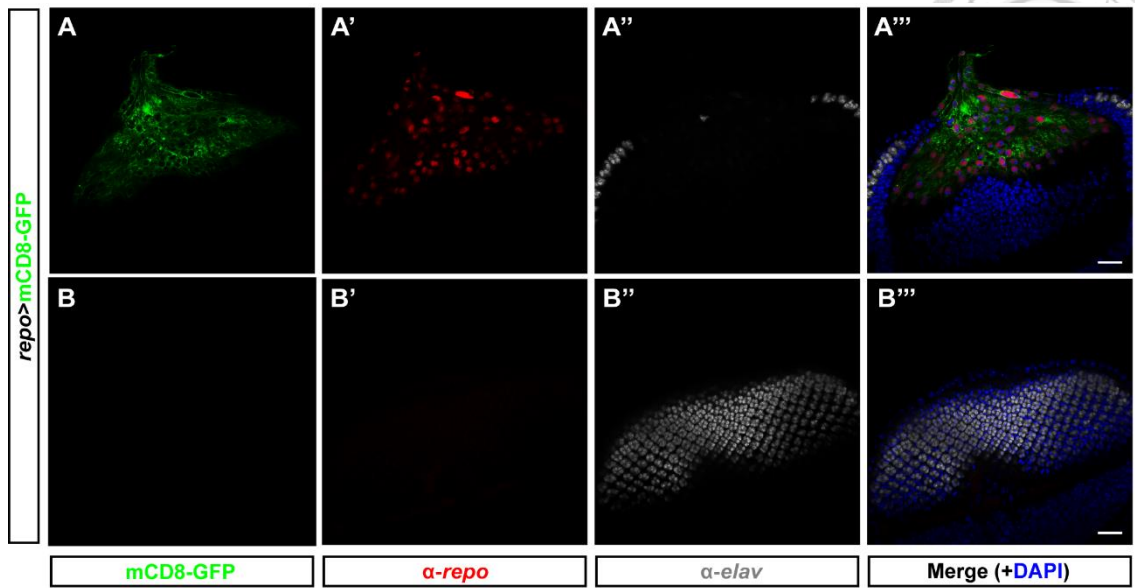
**Fig. 11** *ifc* 和 *Rab4* 對光依賴性神經退化的調控具有互補特性

(A-B) *Rab4KO* 黑暗或照光 10 天的視神經電位紀錄比較，*Rab4KO* 照光 10 天相較於黑暗 10 天的組別在去極化的振幅有顯著變小。視神經電位紀錄的 trace 在(A)；去極化的振幅量化在(B)。

(C-D) *w<sup>1118</sup>*、*Rab4KO*、*Rab4KO>ifc(WT)-mCherry* 的視神經電位紀錄比較，照光 10 天後 *Rab4KO>ifc(WT)-mCherry* 組別的去極化振幅恢復到接近 *w<sup>1118</sup>* 的組別。視神經電位紀錄的 trace 在(C)；去極化的振幅量化在(D)。

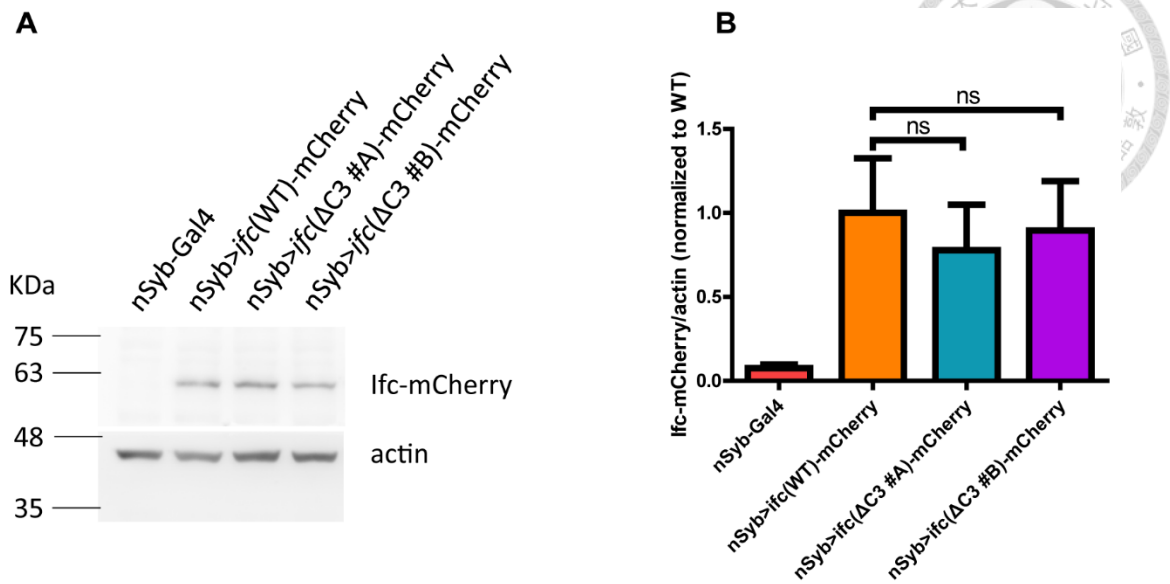
(E-F) *ifc-KO* 遺傳背景和此遺傳背景下加上 *GMR>YFP-Rab4* 的視神經電位紀錄比較，照光 10 天後 *GMR>YFP-Rab4* 組別相較於 *ifc-KO* 的組別在去極化的振幅有顯著增加。視神經電位紀錄的 trace 在(E)；去極化的振幅量化在(F)。

量化圖資訊：(B, D, F)以平均值 ± 標準差呈現；\*\*代表  $P < 0.005$ ，\*\*\*代表  $P < 0.001$  (1way ANOVA)。



**Supplementary Fig. 1** *repo* 啟動子作用範圍不包含神經細胞

(A, B) 以 *repo*-Gal4 過表達 mCD8-GFP 確認 *repo* 啟動子之作用範圍，以 mCD8(綠色)標定 *repo* 啟動子作用位置(A, B)，以  $\alpha$ -*repo*(紅色)標定神經膠細胞(A', B')，以  $\alpha$ -*elav*(灰色)標定神經細胞(A'', B'')，以 DAPI(藍色)標定細胞核(A''', B''')，比例尺：20  $\mu$ m。



**Supplementary Fig. 2 Ifc(WT)-mCherry 和 Ifc(ΔC3)-mCherry 的蛋白表現量無顯著差異**

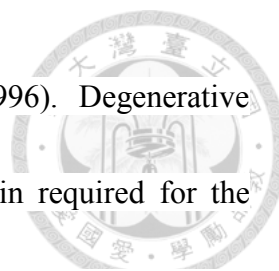
(A, B) 以 *nSyb*-Gal4 在神經細胞過表達 *Ifc*(WT)-mCherry 或 *Ifc*(ΔC3)-mCherry，萃取果蠅頭部的蛋白以西方墨點法比較兩者的蛋白含量。西方墨點法結果在(A)；每一組別 Ifc-mCherry 相較於 actin 的蛋白含量，並以 *nSyb>Ifc*(WT)-mCherry 的數值標準化量化在(B) (n = 6)。

量化圖資訊：(B)以平均值 ± 標準差呈現；ns 代表無顯著差異(1way ANOVA)。



# 第七章

## 參考文獻



- [1] Endo, K., Akiyama, T., Kobayashi, S., & Okada, M. (1996). Degenerative spermatocyte, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in *Drosophila* spermatogenesis. *Molecular and General Genetics MGG*, 253(1-2), 157-165.
- [2] Jung, W. H., Liu, C. C., Yu, Y. L., Chang, Y. C., Lien, W. Y., Chao, H. C., Huang, S. Y., Kuo, C. H., Ho, H. C., & Chan, C. C. (2017). Lipophagy prevents activity□ dependent neurodegeneration due to dihydroceramide accumulation in vivo. *EMBO reports*, 18(7), 1150-1165.
- [3] Yamaji, T., & Hanada, K. (2015). Sphingolipid metabolism and interorganellar transport: localization of sphingolipid enzymes and lipid transfer proteins. *Traffic*, 16(2), 101-122.
- [4] Olson, D. K., Fröhlich, F., Farese Jr, R. V., & Walther, T. C. (2016). Taming the sphinx: mechanisms of cellular sphingolipid homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(8), 784-792.
- [5] Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 139.
- [6] Hla, T., & Dannenberg, A. J. (2012). Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell metabolism*, 16(4), 420-434.
- [7] Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Prinetti, A., & Tettamanti, G. (1997). The role of

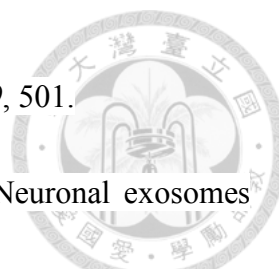


- sphingolipids in the process of signal transduction. *Progress in lipid research*, 36(2-3), 153-195.
- [8] Kolter, T., & Sandhoff, K. (2005). Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annual review of cell and developmental biology*, 21.
- [9] Goñi, F. M., Sot, J., & Alonso, A. (2014). Biophysical properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids.
- [10] Chan, J. P., Hu, Z., & Sieburth, D. (2012). Recruitment of sphingosine kinase to presynaptic terminals by a conserved muscarinic signaling pathway promotes neurotransmitter release. *Genes & development*, 26(10), 1070-1085.
- [11] Kumar, J. P. (2012). Building an ommatidium one cell at a time. *Developmental Dynamics*, 241(1), 136-149.
- [12] Wang, T., & Montell, C. (2007). Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 454(5), 821-847.
- [13] Xiong, B., & Bellen, H. J. (2013). Rhodopsin homeostasis and retinal degeneration: lessons from the fly. *Trends in neurosciences*, 36(11), 652-660.
- [14] Yau, K. W., & Hardie, R. C. (2009). Phototransduction motifs and variations. *Cell*, 139(2), 246-264.
- [15] Karsai, G., Kraft, F., Haag, N., Korenke, G. C., Haenisch, B., Suriyanarayanan, S.,

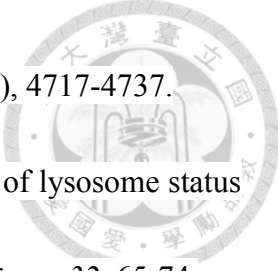


- Steiner, R., Knopp, C., Mull, M., Bergmann, M. *et al* (2018). Aberrant DEGS1 sphingolipid metabolism impairs central and peripheral nervous system function in humans. *bioRxiv*, 347591.
- [16] Pant, D. C., Dorboz, I., Schlüter, A., Fourcade, S., Launay, N., Joya, J., Aguilera-Albesa, S., Yoldi, M. E., Casasnovas, C., Willis, M. J *et al* (2019). Loss of the sphingolipid desaturase DEGS1 causes hypomyelinating leukodystrophy. *The Journal of clinical investigation*.
- [17] Soria, F. N., Pampliega, O., Bourdenx, M., Meissner, W. G., Bezard, E., & Dehay, B. (2017). Exosomes, an unmasked culprit in neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroscience*, 11, 26.
- [18] Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016). Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer cell*, 30(6), 836-848.
- [19] Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2016). A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(4), 251.
- [20] Budnik, V., Ruiz-Cañada, C., & Wendler, F. (2016). Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(3), 160.
- [21] Bátiz, L. F., Castro, M. A., Burgos, P. V., Velásquez, Z. D., Muñoz, R. I., Lafourcade, C. A., Troncoso-Escudero, P., & Wyneken, U. (2016). Exosomes as novel regulators





- of adult neurogenic niches. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 501.
- [22] Bahrini, I., Song, J. H., Diez, D., & Hanayama, R. (2015). Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Scientific reports*, 5, 7989.
- [23] Bulloj, A., Leal, M. C., Xu, H., Castaño, E. M., & Morelli, L. (2010). Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid- $\beta$  degrading protease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), 79-95.
- [24] Tamboli, I. Y., Barth, E., Christian, L., Siepmann, M., Singh, S., Tolksdorf, K., Heneka, M. T., Luetjohann, D., Wunderlich, P., & Walter, J. (2010). Statins promote the degradation of extracellular amyloid  $\beta$ -peptide by microglia via stimulation of exosome-associated IDE secretion. *Journal of biological chemistry*, jbc-M110.
- [25] Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S., & Igarashi, Y. (2012). Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes the clearance of amyloid- $\beta$  by microglia. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M111.
- [26] Baixauli, F., López-Otín, C., & Mittelbrunn, M. (2014). Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Frontiers in immunology*, 5, 403.
- [27] Hessvik, N. P., Øverbye, A., Brech, A., Torgersen, M. L., Jakobsen, I. S., Sandvig, K., & Llorente, A. (2016). PIKfyve inhibition increases exosome release and induces

- 
- secretory autophagy. *Cellular and molecular life sciences*, 73(24), 4717-4737.
- [28] Eitan, E., Suire, C., Zhang, S., & Mattson, M. P. (2016). Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing research reviews*, 32, 65-74.
- [29] Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A. H., Gardiner, C., Sargent, I. L., Wood, M. J., & Cooper, J. M. (2011). Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiology of disease*, 42(3), 360-367.
- [30] Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., Gelé, P., Drobeck, H., Bégard, S., Galas, M. C., Delacourte, A., Beauvillain, J. C., Buée, L. *et al* (2007). Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18197-18205.
- [31] Simón, D., García-García, E., Royo, F., Falcón-Pérez, J. M., & Avila, J. (2012). Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS letters*, 586(1), 47-54.
- [32] Wren, M. C., Zhao, J., Liu, C. C., Murray, M. E., Atagi, Y., Davis, M. D., Fu, Y., Okano, H. J., Ogaki, K., Strongosky, A. J. *et al* (2015). Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutant disrupts subcellular vesicle trafficking and induces cellular stress in iPSC-derived neural stem cells. *Molecular neurodegeneration*, 10(1), 46.
- [33] Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes—vesicular carriers for intercellular



- communication. *Current opinion in cell biology*, 21(4), 575-581.
- [34] Fauré, J., Lachenal, G., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F. *et al* (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(4), 642-648.
- [35] Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO journal*, 30(17), 3481-3500.
- [36] Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., & Poirot, M. (2011). Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical pharmacology*, 81(10), 1171-1182.
- [37] Babst, M. (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current opinion in cell biology*, 23(4), 452-457.
- [38] Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255-289.
- [39] Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Developmental cell*, 21(1), 77-91.
- [40] Henne, W. M., Stenmark, H., & Emr, S. D. (2013). Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in*



*biology*, 5(9), a016766.

[41] Marsh, M., & van Meer, G. (2008). No ESCRTs for exosomes. *Science*, 319(5867), 1191-1192.

[42] Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247.

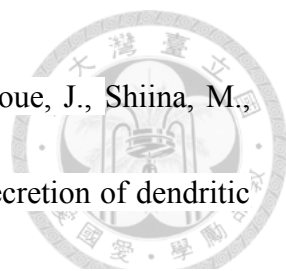
[43] Xu, T., & Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*, 117(4), 1223-1237.

[44] Stowers, R. S., & Schwarz, T. L. (1999). A genetic method for generating *Drosophila* eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype. *Genetics*, 152(4), 1631-1639.

[45] Newsome, T. P., Asling, B., & Dickson, B. J. (2000). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development*, 127(4), 851-860.

[46] Bazigou, E., Apitz, H., Johansson, J., Lorén, C. E., Hirst, E. M., Chen, P. L., Palmer, R. H., & Salecker, I. (2007). Anterograde Jelly belly and Alk receptor tyrosine kinase signaling mediates retinal axon targeting in *Drosophila*. *Cell*, 128(5), 961-975.

[47] Silies, M., Yuva, Y., Engelen, D., Aho, A., Stork, T., & Klämbt, C. (2007). Glial cell migration in the eye disc. *Journal of Neuroscience*, 27(48), 13130-13139.



[48] Tamai, K., Tanaka, N., Nakano, T., Kakazu, E., Kondo, Y., Inoue, J., Shiina, M., Fukushima, K., Hoshino, T., Sano, K. *et al* (2010). Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 399(3), 384-390.

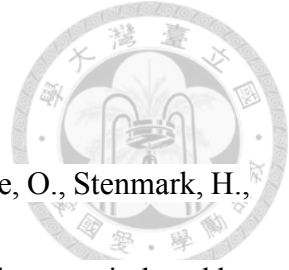
[49] Lloyd, T. E., Atkinson, R., Wu, M. N., Zhou, Y., Pennetta, G., & Bellen, H. J. (2002). Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell*, 108(2), 261-269.

[50] Teis, D., Saksena, S., Judson, B. L., & Emr, S. D. (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *The EMBO journal*, 29(5), 871-883.

[51] Mazzeo, C., Calvo, V., Alonso, R., Mérida, I., & Izquierdo, M. (2016). Protein kinase D1/2 is involved in the maturation of multivesicular bodies and secretion of exosomes in T and B lymphocytes. *Cell death and differentiation*, 23(1), 99.

[52] Ventimiglia, L. N., Fernández-Martín, L., Martínez-Alonso, E., Antón, O. M., Guerra, M., Martínez-Menárguez, J. A., Andrés, G., & Alonso, M. A. (2015). Cutting edge: regulation of exosome secretion by the integral MAL protein in T cells. *The Journal of Immunology*, 1500891.

[53] Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lütcke, A., Gruenberg, J., & Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in



- endocytosis. *The EMBO journal*, 13(6), 1287-1296.
- [54] Wegener, C. S., Malerød, L., Pedersen, N. M., Prodigal, C., Bakke, O., Stenmark, H., & Brech, A. (2010). Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5. *Histochemistry and cell biology*, 133(1), 41.
- [55] Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Mittelbrunn, M., Fernández-Delgado, I., Torralba, D., Moreno-Gonzalo, O., Baldanta, S., Enrich, C., Guerra, S., & Sánchez-Madrid, F. (2016). ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nature communications*, 7, 13588.
- [56] van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Mâle, P., Goud, B., & Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, 70(5), 729-740.
- [57] Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M., & Mellman, I. (1999). The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *The Journal of cell biology*, 145(1), 123-139.
- [58] Vidal, M. J., & Stahl, P. D. (1993). The small GTP-binding proteins Rab4 and ARF are associated with released exosomes during reticulocyte maturation. *European journal of cell biology*, 60(2), 261-267.
- [59] Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., & Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature cell biology*, 14(10), 1036.

[60] Hernández-Tiedra, S., Fabrias, G., Dávila, D., Salanueva, I. J., Casas, J., Montes, L. R., Antón, Z., García-Taboada, E., Salazar-Roa, M., Lorente, M. *et al* (2016).

Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy*, 12(11), 2213-2229.

[61] Löfgren, H., & Pascher, I. (1977). Molecular arrangements of sphingolipids. The monolayer behaviour of ceramides. *Chemistry and physics of lipids*, 20(4), 273-284.

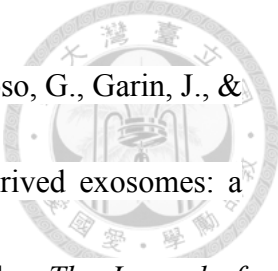
[62] Pascher, I. (1976). Molecular arrangements in sphingolipids conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(2), 433-451.

[63] Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), 925-937.

[64] Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200(4), 373-383.

[65] Maas, S. L., Breakefield, X. O., & Weaver, A. M. (2017). Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. *Trends in cell biology*, 27(3), 172-188.

[66] Buschow, S. I., Liefhebber, J. M., Wubbolts, R., & Stoorvogel, W. (2005). Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(3), 398-403.



[67] Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7309-7318.

[68] Booth, A., Marklew, C. J., Ciani, B., & Beales, P. A. (2018). In vitro membrane remodelling by ESCRT-II/ESCRT-III is regulated by negative feedback from membrane tension. *bioRxiv*, 438481.