

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) 於神經中调控細胞內膜運輸與
外吐小體分泌

infertile crescent (ifc) regulates intracellular trafficking
and exosome secretion for neuronal maintenance

游宇蓮

Yu-Lian Yu

指導教授：詹智強博士

Advisor: Chih-Chiang Chan, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

摘要

Infertile crescent (*Ifc*) 為演化上具高度保守性的脂質修飾酵素，負責在果蠅神經脂質新合成路徑中將二羥基神經醯胺(dihydroceramide, DHCer)轉變成神經醯胺(ceramide, Cer)。為瞭解 *ifc* 在神經的功能，我們於果蠅眼睛建立 *ifc*-KO 突變細胞群組(mutant clone)，發現失去 *ifc* 會導致成體視神經的漸進式活性依賴退化。

為瞭解其神經退化之機制，我們以 *ifc*-KO 全感光細胞突變群組(*ifc*-KO whole eye clone)進行研究，發現失去 *ifc* 會導致果蠅視神經中參與光傳遞路徑的 Rhodopsin 1 與調控桿狀小體(rhabdomere)形成之 Chaoptin 堆積，但不影響發育時期 Eyes shut 蛋白的分佈。由於 *ifc* 參與神經脂質新合成路徑，因此我們在群組分析中檢測失去 *ifc* 是否影響脂質恆定，發現在 *ifc*-KO 感光細胞突變群組分析中有脂質堆積，且脂噬作用提昇。前人研究發現光刺激會活化 Rac1 導致 NADPH oxidase (Nox)產生 ROS，而我們觀察到失去 *ifc* 後 ROS 提升，並且透過藥物抑制 Nox 後，ROS 下降，以及保護神經免於光依賴退化。此外，我們亦發現 *Ifc* 位於 Rab4 相關之外吐小體(exosome)，並可於視神經細胞中觀察到錐細胞或色素細胞過表達之 *Ifc*-mCherry 蛋白，推測 *Ifc* 可離開製造細胞產生細胞非自主機制(cell non-autonomously)之作用，並參與調控 exosome 分泌作用。

此研究除了瞭解 *ifc* 於視神經活性依賴退化中扮演的角色，也探討細胞外吐作用的調控，除對 *ifc* 之功能更加瞭解外，或許也能作為神經細胞與其他細胞溝通的基礎。

Abstract



Infertile crescent (*Ifc*) is an evolutionarily conserved lipid-modifying enzyme that converts dihydroceramide (DHCer) into ceramide in *de novo* sphingolipid synthesis. To investigate the functional role of *ifc* in neurons, we established the *ifc*-KO mutant clone in adult eye and revealed that photoreceptors underwent a progressive, light-dependent neurodegeneration in the absence of *ifc*.

To further investigate the mechanism of light-dependent degeneration we examined the accumulation of cargoes of membrane trafficking including Rhodopsin 1(Rh1), Choptin(Chp) and Eyes shut(Eys) in whole-eye *ifc*-KO clones. Whereas both Rh1 and Chp accumulated, the level and distribution of Eys, a secreted protein required for photoreceptor development, did not change. This finding suggests that loss of *ifc* does not disrupt early neuronal development.

Next, we examined whether loss of *ifc* affects lipid homeostasis. We recently showed that loss of *ifc* leads to lipid accumulation and activation of lipophagy. Light induces Rac1–NADPH oxidase (Nox) activity and produces ROS (Chartier, Hardy et al. 2012). Interestingly, we showed that both ROS increase and light-dependent neurodegeneration upon loss of *ifc* can be rescued by feeding *ifc*-KO flies with Nox inhibitor Apocynin. Thus, inhibition of NOX activation prevents *ifc*-KO photoreceptors from degeneration.

To understand the subcellular mechanism, we have identified that *Ifc* colocalizes with Rab4-related exosomes and *Ifc*-mCherry expressed from cone or pigment cells is detected within photoreceptors, suggesting *ifc* can leave from producing cells and functions cell non-autonomously. More detailed experiments are needed to further

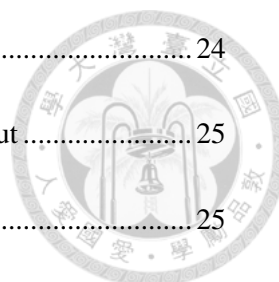
address the role of *ifc* on neurons and exocytosis, which potentially will shed light on the communication between neurons and supporting cells.



目錄



摘要.....	i
Abstract	ii
目錄.....	iv
第一章 實驗背景.....	1
1.1 神經脂質與細胞膜狀胞器運輸機制.....	2
1.2 Dihydroceramide desaturase 於哺乳類細胞及果蠅中之功能.....	5
1.3 細胞內膜運輸與視神經細胞活性依賴退化.....	6
1.4 光刺激與 ROS	9
1.5 Rab 與外吐小體.....	11
第二章 實驗材料與方法.....	14
2.1 果蠅株及培養方法.....	15
2.2 果蠅食物培養基製備.....	16
2.3 視神經電位紀錄(Electroretinogram)	16
2.4 免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡(Confocal microscope)使用.....	17
2.5 免疫染色抗體清單(IHC Antibody List)	19
2.6 群組分析(Clonal analysis).....	20
2.7 果蠅餵食藥劑實驗製備.....	21
第三章 實驗結果.....	22
3.1 在果蠅視神經失去 <i>ifc</i> 造成漸進式活性細胞退化.....	23
3.2 在果蠅視神經失去 <i>ifc</i> 造成脂噬作用增加.....	23



3.3 在果蠅視神經失去 <i>ifc</i> 會導致 Rh1 堆積在 Atg8a 相關胞器	24
3.4 在果蠅視神經失去 <i>ifc</i> 會造成 Choptin 堆積，但不影響 Eyes shut	25
3.5 減少 Rh1 表現會恢復失去 <i>ifc</i> 後產生的漸進式神經退化.....	25
3.6 餵食 Apocynin 抑制 NOX 會恢復 <i>ifc</i> -KO 造成的神經退化與降低 ROS	25
3.7 果蠅神經膠細胞表現 <i>Ifc</i> -mCherry 會出現在視神經細胞	26
3.8 <i>Ifc</i> 與內生性 Rab4 共位	26
3.9 在果蠅三齡幼蟲眼碟細胞外之 <i>Ifc</i> 位於 Rab4-EYFP 相關之囊泡	27
3.10 <i>Ifc</i> 位於 Flo2-EYFP 相關之囊泡	27
3.11 果蠅三齡幼蟲眼碟細胞之 <i>Ifc</i> -mCherry 與 mCD8::GFP 可離開製造細胞	27
第四章 實驗討論	29
4.1 <i>ifc</i> 為細胞非自主機制及其在神經細胞與神經膠細胞之功能	30
4.2 <i>ifc</i> 與細胞膜上的蛋白運輸之調控	30
4.3 失去 <i>ifc</i> 產生的活性依賴退化與 Rac1-NOX pathway 之關係.....	32
4.4 <i>ifc</i> 與 Rab4 調控之外吐小體的關係.....	33
第五章 未來實驗方向	34
5.1 探討在視神經細胞或神經膠細胞失去 <i>ifc</i> 對果蠅視神經存活之影響	35
5.2 探討 <i>ifc</i> 與 <i>rab4</i> 調控的外吐小體之交互作用	35
5.3 探討 <i>ifc</i> 對果蠅視神經中外吐小體生成與分泌的調控	36
5.4 <i>ifc</i> 是否影響 lipid raft 上之 Flo2 蛋白造成細胞膜內運輸與內吞作用失常	38
第六章 實驗圖表	39
Fig. 1 在果蠅視神經失去 <i>ifc</i> 造成漸進式活性細胞退化	40
Fig. 2 在果蠅視神經失去 <i>ifc</i> 造成脂噬作用增加	41

Fig. 3 在果蠅視神經失去 <i>ifc</i> 會造成 Rh1 堆積在 Atg8a 相關胞器.....	42
Fig. 4 在果蠅視神經失去 <i>ifc</i> 會造 Chaoptin 堆積，但不影響 Eyes shut.....	43
Fig. 5 減少 Rh1 表現會恢復失去 <i>ifc</i> 後產生的漸進式神經退化.....	44
Fig. 6 餵食 Apocynin 抑制 NOX 會恢復 <i>ifc</i> -KO 產生的漸進式神經退化與降低 ROS45	
Fig. 7 果蠅神經膠細胞表現 <i>Ifc</i> -mCherry 會出現在視神經細胞.....	46
Fig. 8 <i>Ifc</i> 與內生性 Rab4 共位.....	47
Fig. 9 果蠅三齡幼蟲眼碟細胞外之 <i>Ifc</i> 位於 Rab4-EYFP 相關之囊泡.....	48
Fig. 10 <i>Ifc</i> 位於 Flo2-YFP 相關之囊泡.....	49
Fig. 11 果蠅三齡幼蟲眼碟細胞外之 <i>Ifc</i> -mCherry 與 mCD8::GFP 可離開表現細胞....	50
第七章 參考文獻.....	51



第一章 實驗背景

1.1 神經脂質與細胞膜狀胞器運輸機制

細胞膜(cellular membranes)可指劃分細胞內與外的雙層細胞質膜(plasma membranes)或是分隔(compartmentalize)細胞中各式胞器的膜狀結構。在真核生物中，膜狀構造主要由三種脂質組成，分別為：甘油脂(Glycerolipids)、固醇(Sterols)與神經脂質(Sphingolipids)，其組成比例隨不同區域而有所改變(Sankaram and Thompson 1990)。

神經脂質是由鞘氨醇鹼(sphingoid base)和醯基(acyl group)所構成之脂質，在細胞質膜上與固醇形成脂筏(lipid raft)調控訊號傳遞(Schroeder, London et al. 1994, Lingwood and Simons 2010)。此外，神經脂質也被發現會位於細胞內不同膜狀胞器中，如粒線體(mitochondria)或自噬小體(autophagosome)(Zheng, Kollmeyer et al. 2006)，而神經脂質的回收和分解也出現在不同的膜狀胞器中，如內體(endosome)、自噬小體、溶酶體(lysosome)(Zheng, Kollmeyer et al. 2006)。

生物體中，大部分神經脂質可經由神經脂質新合成路徑所合成(Figure. 1)(Hannun and Obeid 2008, Hla and Dannenberg 2012)，在哺乳類細胞中，內質網(endoplasmic reticulum)中的絲氨酸棕櫚油酸轉移酶(serine-palmitoyl transferase)會將絲胺酸(serine)及棕櫚醯輔酵素 A (palmitoyl-CoA)轉換成二氫鞘氨醇(sphinganine)，之後經神經醯胺合成酶(Ceramide synthase)作用轉變為dihydroceramide，再由 Dihydroceramide desaturase 轉變為神經醯胺(ceramide)，後送往高基氏體(Golgi)由 Ceramidase 修飾形成鞘氨醇(sphingosine)，或由 Sphingomyelin synthase 加上 phosphocholine 形成神經磷脂(sphingomyelin)，以及醣類修飾的腦脂醣苷(cerebrosides)和神經節醣苷(glycosphingolipids)(Hannun and Obeid 2008)。Sphingomyelin、cerebrosides 和 glycosphingolipids 可經由補救合成路徑(Salvage pathway) (Figure. 1)在次級內體與溶酶體內被降解為 ceramide (Riboni, Viani et al. 1997, Kolter and Sandhoff 2005)，故 ceramide 可作為中間循環調控各下游代謝 sphingolipids 含量之重要角色。

以下介紹前人研究中各神經脂質代謝酵素與膜狀胞器運輸機制的關係：

Sphingosine kinase

研究發現，Sphingosine kinase(SPHK)藉由將 sphingosine (Sph) 轉變成水溶性的 sphingosine-1-phosphate (S1P)來調控 membrane dynamics，影響細胞內吞與外吐作用(Goni, Sot et al. 2014)。

膜蛋白內化後會被運送至次級內體(late endosome)及溶酶體降解，或者至再循環內體(recycling endosome)後運回細胞膜。在果蠅的視神經細胞中，過表達或失去 SPHK 影響了 dihydrosphingosine 1 phosphate (DHS1P)與 S1P 之比例，當 DHS1P/S1P 比例提升時，會增加 G protein-coupled receptor Rhodopsin 以及 light-sensitive transient receptor potential (TRP)經由 endolysosomal trafficking 之降解(Acharya, Patel et al. 2003, Yonamine, Bamba et al. 2011)。在哺乳動物細胞上降低 SPHK 表現量，會造成 transferrin uptake 與 recycling 受損，證明了 S1P 對於 endocytic membrane recycling 是重要的(Shen, Giordano et al. 2014)。

線蟲的 SPHK-1 位於神經突觸前末端，在失去 SPHK-1 的線蟲中，神經發育正常，但是神經肌肉接合處(neuromuscular junctions)的神經傳導物質釋放受損，蕁毒鹼活化劑(Muscarinic agonists)刺激異三聚體蛋白質(heterotrimeric G protein) Gαq 以及下游效應子 Trio Rho GEF 反應，造成突觸前 SPHK-1 增加，促使神經傳導物質釋放(Chan, Hu et al. 2012)，另一研究指出，鈣離子內流亦會使突觸前末端 SPHK-1 增加，並召集 soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor (SNARE) Munc13 協助突觸小泡釋放(Chan and Sieburth 2012)，證明線蟲中，S1P 代謝對於突觸小泡與突觸前末端膜融合機制有關。老鼠研究中，Sph 被認為會活化突觸小泡膜上負責調控膜融合的 SNARE 蛋白 Synaptobrevin，刺激 Synaptobrevin 與細胞膜上的 Syntaxin/SNAP-25 異源二聚體形成三元 SNARE 複合體，促進細胞 exocytosis(Darios, Wasser et al. 2009)。

Sphingomyelinase

先前研究利用老鼠寡突神經膠細胞多泡體數目較多之特性(Trajkovic, Dhaunchak et al. 2006)來研究組成髓磷脂(myelin)的 proteolipid protein (PLP)相關的外吐小體之形成與釋放機制。研究發現經超速離心(Ultracentrifugation)後，PLP 與外吐小體標誌 Alix 和 Flotillin 位於同一分層(de Gassart, Geminard et al. 2003)，顯示 PLP 可能藉外吐小體運輸到其他細胞，隨後免疫電顯亦證明了 PLP 位於外吐小體上。藉由 RNAi 技術抑制 ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)調控機制(Hurley and Emr 2006, Williams and Urbe 2007)，發現並無影響具 PLP 囊泡的膜內運輸，且因為 PLP 具有 raft-type microdomains，故推論 PLP 相關的外吐小體釋放機制可能與 ceramide 含量有關，利用 RNAi 技術以及藥物抑制 Neutral Sphingomyelinase 表現量及活性來降低由 sphingomyelin 轉化成 ceramide 的效率(Clarke, Snook et al. 2006)，發現降低了 ceramide 含量後 PLP 相關的外吐小體之釋放亦減少，而透過外加 Sphingomyelinase 亦可促使模擬 lipid-raft 之膜向外分泌囊泡，因此推論 ceramide 可以促使管腔內囊泡生成而誘發外吐小體釋放(Trajkovic, Hsu et al. 2008)。

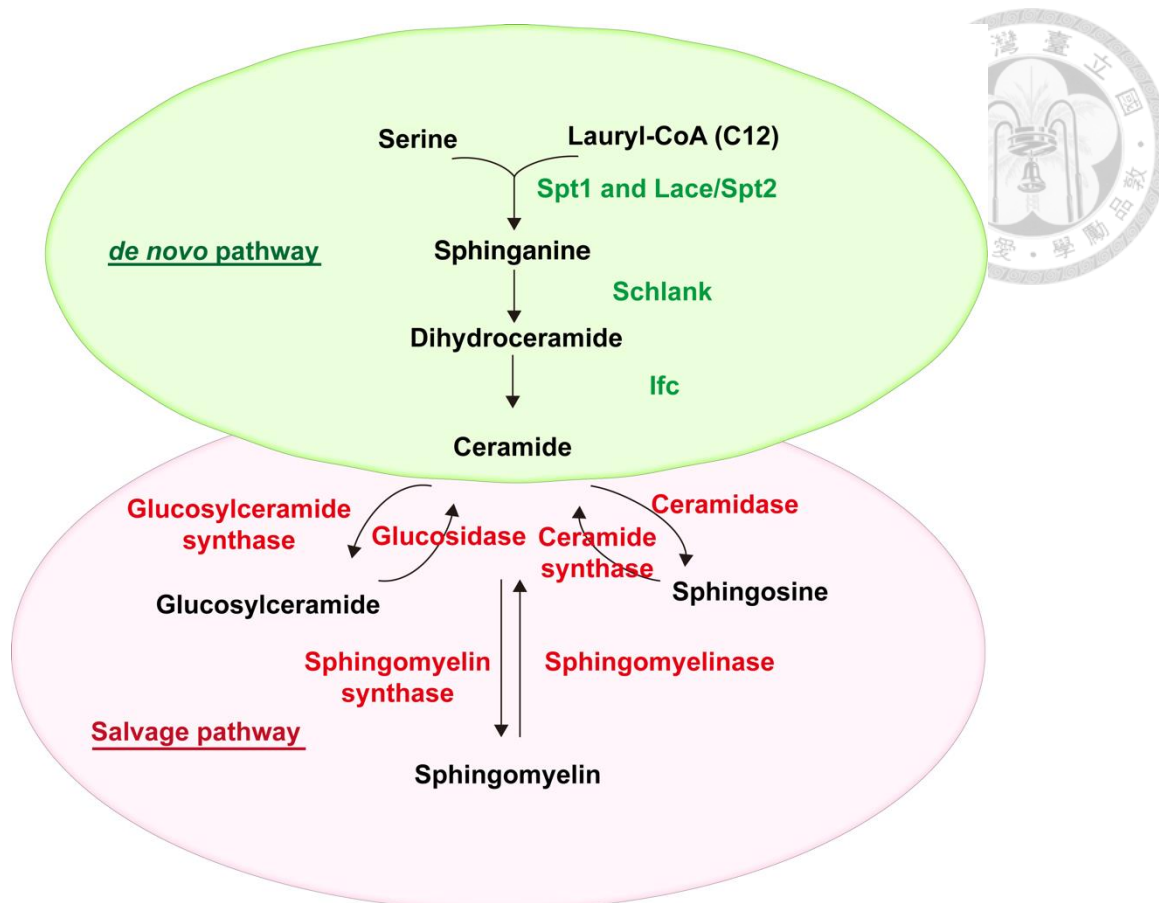



Figure. 1 神經脂質新合成路徑(sphingolipid *de novo* pathway)與補救合成路徑 (Salvage pathway)

1.2 Dihydroceramide desaturase 於哺乳類細胞及果蠅中之功能

Dihydroceramide desaturase (DEGS)參與神經脂質新合成路徑(sphingolipid *de novo* synthesis pathway)，負責將 dihydroceramide 轉化為 ceramide，哺乳類動物分為 DEGS1 與 DEGS2，果蠅中則為 Infertile crescent(Ifc)。

在神經脂質新合成路徑中，神經醯胺為重要的中間產物，而神經醯胺的合成主要發生在內質網(endoplasmic reticulum)膜上，藉由 Dihydroceramide desaturase 將 dihydroceramide 轉變成神經醯胺(Michel and van Echten-Deckert 1997)。哺乳類具有兩種 dihydroceramide desaturase:DEGS1 和 DEGS2。DEGS1 具 $\Delta 4$ desaturase 活性，負責將 dihydroceramide 加上 4,5 trans double bond，形成神經醯胺(Michel, van Echten-Deckert et al. 1997)。而 DEGS2 則同時具有 $\Delta 4$ desaturase 和 c-4




hydroxylase 兩種活性，負責生成神經醯胺和 phytoceramides。此兩種酵素的表現器官也不同，DEGS1 廣泛表現在全身，但其表現量和活性於肝臟、腎臟與肺臟較強(Causeret, Geeraert et al. 2000, Omae, Miyazaki et al. 2004)。而 DEGS2 的表現則大多侷限於 phytoceramides 有重要功能的器官，如皮膚、小腸和腎臟(Mizutani, Kihara et al. 2004, Omae, Miyazaki et al. 2004)。研究發現，DEGS1 可能參與調控細胞凋亡，在 COS-7 細胞中，DEGS1 的豆蔻酸化修飾(myristoylation)會導致其移至粒線體，使粒線體中的神經醯胺增加，導致細胞凋亡(Beauchamp, Tekpli et al. 2009)。亦有研究發現，完全失去 DEGS1 的胚胎纖維母細胞(mouse embryonic fibroblasts)能抵抗處理 etoposide 後所產生的細胞凋亡(Siddique, Bikman et al. 2012)。近期研究也發現 DEGS1 除了 $\Delta 4$ desaturase 活性之外，也具有視網醇異構酶(retinol isomerase)的活性，能將反式視黃酯(trans-retinyl ester)轉換成順式視網醇(cis-retinol)(Kaylor, Yuan et al. 2013)，因此 DEGS1 也可能參與錐色素再生(cone pigment regeneration)。

果蠅的 *dihydroceramide desaturase* 同源基因為 *infertile crescent (ifc)* 或稱 *des-1*(Endo, Akiyama et al. 1996)，其與人類之 Dihydroceramide desaturase 1 有 62% 之一致性(identity)及 75% 相似性(similarity)，與人類之 Dihydroceramide desaturase 2 有 58% 之一致性及 72% 相似性，且在負責將 dihydroceramide 加上雙鍵的 $\Delta 4$ -sphingolipid-FADS-like domain 中 56 個胺基酸有 75% 完全相同(Endo, Akiyama et al. 1996)，顯示其在演化上之高度保守性。

1.3 細胞內膜運輸與視神經細胞活性依賴退化

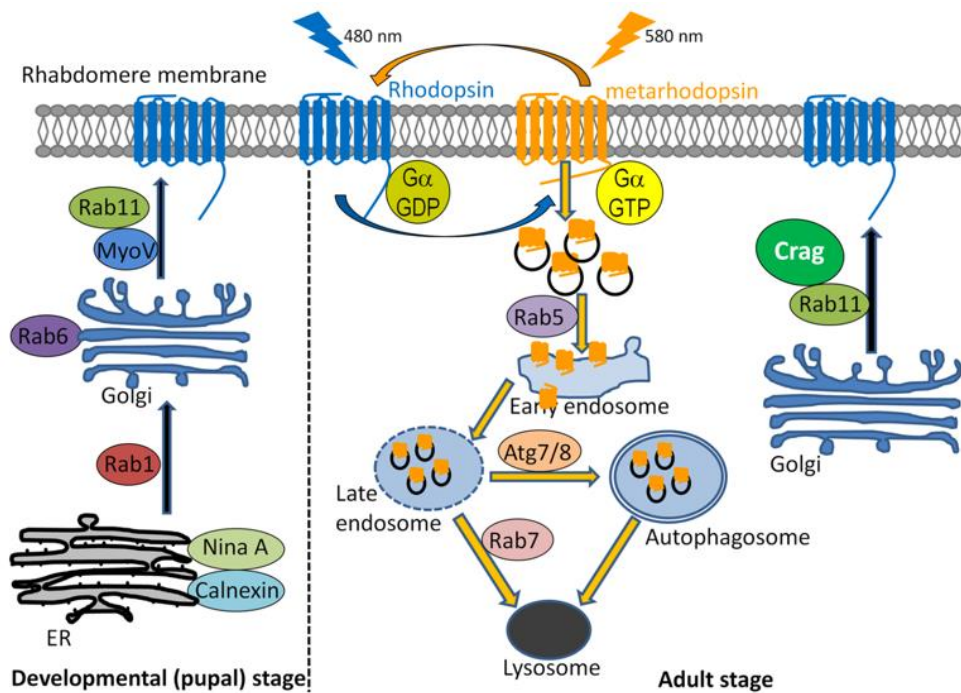
果蠅的複眼約由 800 個小眼(ommatidia)組成(Wang and Montell 2007, Yau and Hardie 2009, Kumar 2012, Xiong and Bellen 2013)，各個小眼內含 8 個桿狀小體(rhabdomeres, R1-R8)，桿狀小體上具有 Rhodopsin 蛋白表現(Alvarez 2008)，Rhodopsin 1 (Rh1)為最主要表現在 R1-R6 之 Rhodopsin 蛋白(Wang and Montell



2007, Kumar 2012, Xiong and Bellen 2013)。Rh1 經由內質網生成與折疊，經高基氏體修飾後運送至桿狀小體之緻密堆疊細胞膜，此路徑為 secretory pathway(Figure. 2)(Xiong and Bellen 2013)。當參與 Rh1 合成、修飾或運送之蛋白發生突變會導致果蠅視神經細胞發育不良或退化(Kurada and O'Tousa 1995, Rosenbaum, Hardie et al. 2006, Cao, Li et al. 2011, Rosenbaum, Brehm et al. 2011, Lee, Song et al. 2013)。視神經細胞內的光傳遞路徑藉由光子活化 Rh1(Kiselev and Subramaniam 1994)，活化後的 Rh1(Metarhodopsin, Mrh)會刺激 phospholipase C (PLC)(Running Deer, Hurley et al. 1995)水解 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)後製造 diacylglycerol (DAG)(Bloomquist, Shortridge et al. 1988)。DAG 其下游代謝物會活化瞬態受體電位(Transient Receptor Potential, TRP)陽離子通道開啟，導致視神經細胞去極化(Niemeyer, Suzuki et al. 1996, Chyb, Raghu et al. 1999, Leung, Geng et al. 2000)。活化之 Rh1(metarhodopsin, Mrh)經橘光照射後會被轉化為不活化態的 Rh1(Kiselev and Subramaniam 1994)。部分 Mrh 會被內吞至內體與溶酶體結合降解或經由自噬作用分解(Figure. 2)(Kiselev, Socolich et al. 2000, Xu, Lee et al. 2004, Orem, Xia et al. 2006)。當 Rh1 去活化態作用失常(Dolph, Ranganathan et al. 1993, Alloway, Howard et al. 2000)或是內溶酶體路徑受損會造成 Rh1 堆積導致視神經細胞活性依賴退化(Chinchore, Mitra et al. 2009, Dourlen, Bertin et al. 2012)。

果蠅的視神經細胞之頂端面會形成緻密聚集之微絨毛(microvilli)構造，微絨毛聚集組織成感光性桿狀小體(photosensitive rhabdomeres)接收光刺激。研究指出桿狀小體之構造及功能分別與 *prominin*(Prom), *eyes shut*(Eys), *crumbs*(Crb)及 *chaoptin* (Chp)有關(Table.1)(Husain, Pellikka et al. 2006, Zelhof, Hardy et al. 2006, Nie, Mahato et al. 2012, Gurudev, Yuan et al. 2014)，Prom 與 Eys 會促進桿狀小體分離，而 Crb 與 Chp 則協助桿狀小體黏附，果蠅視神經細胞透過上述蛋白質的交互作用在各個小眼中形成適當的桿狀小體間隙(inter-rhabdomeral space, IRS)以執

行感光功能。目前已知 *prom*, *eyes*, *crb* 失去功能之突變果蠅株其桿狀小體型態異常，產生視神經活性依賴退化之現象，且此退化可藉由餵食缺乏維他命 A 之食物拯救，推論視神經細胞死亡與 Rh1 堆積有關，*chp* 失去功能之突變果蠅株造成微絨毛不規則聚集的形態異常，但無視神經活性依賴退化之現象，且其形態異常無法藉由餵食缺乏維他命 A 之食物拯救(Gurudev, Yuan et al. 2014)。



(Xiong and Bellen 2013)

Figure. 2 Rh1 生成與活化後細胞內降解路徑

	Prom	Eys	Crb	Chp	Rh1
Protein type	Transmembrane protein	Glycoprotein	Transmembrane protein	Glycoprotein	G protein-coupled receptor
Localization	Rhabdomic membrane	Interrhabdomeral Space	Stalk membrane	Basolateral membrane	Rhabdomeres
Secretory stage	?	Early to mid-pupal stages			
Synthesis stage	?	?	Larval stage to adult stage	Larval stage to adult stage	70% pupal development to adult stage
Light-dependent neurodegeneration	Yes	Yes	Yes	?	Yes

Table. 1 Prom, Eys, Crb 與 Chp 之比較

1.4 光刺激與 ROS

GTPase Rac1 在調控細胞的型態、極性與凋亡作用上扮演重要角色(Jaffe and Hall 2005)。如同其他 GTPases，Rac1 會藉和 GDP 或 GTP 結合，轉變成於細胞質中的不活化態或於膜上的活化態。受到訊號刺激後 guanine nucleotide exchange factors (GEFs)會驅使 Rac1 和 GTP 結合，使其可以和下游效應子(effector)交互作用，驅動細胞內各式生物反應。GTPase-activating proteins (GAPs)則可將活化態 Rac1 之 GTP 水解為 GDP，轉為不活化態。研究指出在特定組織過表達顯性抑制(dominant-negative form)與顯性活躍(dominant-active form)之 Rac1 會出現組織特定表型(tissue-specific phenotype)，顯示 Rac1 在各個組織間具有重要功能。在 *rhodopsin* 空白突變(null mutant)同型合子果蠅同一小眼中，R1、R2 與 R6 只餘部分桿狀小體存在，R3、R4 與 R5 幾乎消失，顯示失去 *rhodopsin* 會造成其桿狀小體型態異常，在此果蠅中過表達顯性活躍之 Rac1 可以部分拯救桿狀小體型態，且在野生型果蠅上過表達顯性抑制之 Rac1 亦會造成類似 *rhodopsin* null mutant 同型合子果蠅之桿狀小體異常現象，顯示 Rac1 在 Rhodopsin 調控之視神經細胞形態上扮演重要角色(Chang and Ready 2000)。哺乳動物視網膜的研究發現，光線會刺激 Rac1 活化(Balasubramanian and Slepak 2003, Belmonte, Santos et al. 2006)，活化後的 Rac1 會啟動 NADPH oxidase 作用，產生活性氧物種(reactive

oxygen species, ROS)(Sundaresan, Yu et al. 1996, Park, Lee et al. 2004, Jaffe and Hall 2005), 目前研究已知 ROS 異常增加會造成視網膜病變(Komeima, Rogers et al. 2007, Lambeth 2007, Kang, Lemke et al. 2009, Usui, Oveson et al. 2009)。果蠅的 Crumbs (*crb*)與其哺乳類同源基因 CRB1-3 在演化上具有保守性，目前已知在表皮細胞極化與視神經之型態生成和穩定中扮演重要角色。研究指出人類 CRB1 基因突變會造成視網膜病變(retinal dystrophies)(den Hollander, ten Brink et al. 1999, Gosens, den Hollander et al. 2008, Bulgakova and Knust 2009)，而在果蠅的表皮細胞與視神經細胞研究指出，Crb 會抑制 Rac1-NADPH oxidase 相關之 ROS 產生(Chartier, Hardy et al. 2012)(Figure. 3)，抑制 NADPH oxidase 降低 ROS 能恢復 *crb* 同型合子突變之果蠅胚胎其表皮細胞缺陷，且降低 Rac1 或 NADPH oxidase 活性皆能預防失去 *crb* 所造成的視神經細胞退化現象，顯示在光線刺激下，Crb 透過抑制 Rac1-NADPH oxidase 活性扮演一個保護視神經細胞的角色。

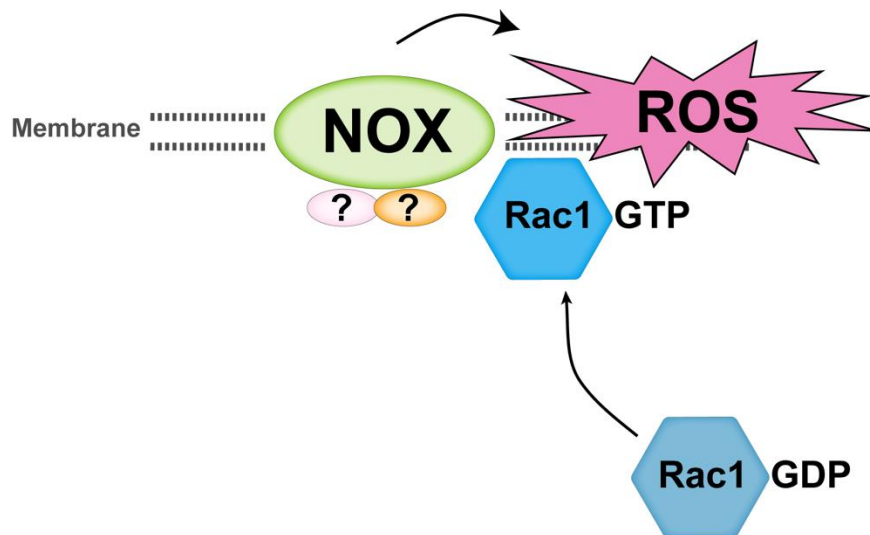
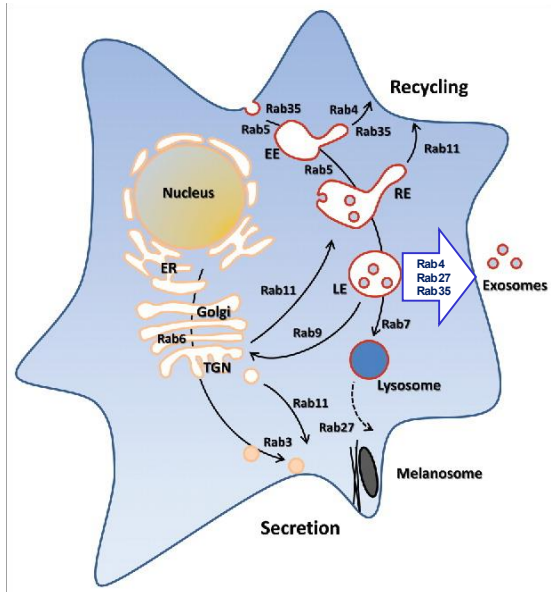


Figure. 3 Rac1-NOX 產生 ROS 之路徑

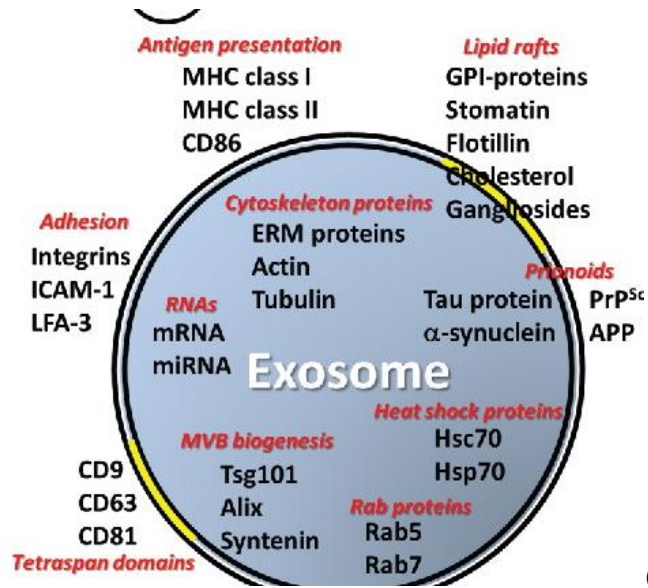
1.5 Rab 與外吐小體

細胞之間可透過分泌胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)來溝通，胞外囊泡依據產生的來源分為：外吐小體(exosomes)、微泡(microvesicles)與凋亡小體(apoptotic bodies)(Yanez-Mo, Siljander et al. 2015)，目前研究較著重在外吐小體與微泡上(Kalra, Simpson et al. 2012)。外吐小體特指多泡體(multivesicular bodies, MVBs)釋放到細胞外之管腔內囊泡(intraluminal vesicles, ILVs)(Heijnen, Schiel et al. 1999)。內體特限膜(limiting endosomal membrane)透過 ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 調控機制或 ceramide 調控機制(ESCRT-independent mechanisms)內陷形成含有許多管腔內囊泡之多泡體(Carayon, Chaoui et al. 2011, van Niel, Charrin et al. 2011, Perez-Hernandez, Gutierrez-Vazquez et al. 2013, Colombo, Raposo et al. 2014)，多泡體與細胞膜融合後釋放出管腔內囊泡到細胞外，此外吐小體分泌過程受到 Rab(Figure. 4)與 SNARE complex 之調控(Hsu, Morohashi et al. 2010, Ostrowski, Carmo et al. 2010, Gross, Chaudhary et al. 2012)，在哺乳類網狀紅血球細胞的研究中，發現外吐小體與 Rab4 出現在同一分層中，推論 Rab4 可能位於外吐小體上(Vidal and Stahl 1993)，前人研究以 *wg-GAL4* 在果蠅翅膀器官碟(wing imaginal disc)過表達 YFP-Rab4，發現 Wg 訊號與 YFP-Rab4 在細胞外共同存在，顯示 Rab4 可能為一外吐小體標誌(Gross, Chaudhary et al. 2012)，其餘常見的外吐小體標誌為 CD63、TSG101、Flotillin 與 Alix(Figure.5)。



adapted from (Blanc and Vidal 2017)

Figure. 4 真核細胞內 Rab GTPases 調控細胞中膜狀胞器的運輸，其中 Rab4 與 Rab11 參與再循環內體運輸，Rab4、Rab27 與 Rab35 調控外吐小體釋放。



(Blanc and Vidal 2017)

Figure. 5 外吐小體與其組成蛋白，其中 CD63、TSG101、Flotillin 與 Alix 為常見的外吐小體標誌。



第二章

實驗材料與方法

2.1 果蠅株及培養方法



實驗果蠅在 25°C 恆溫培養箱中或在室溫飼養於標準培養基。

果蠅株	基因型	來源
FRT40A	$y^{d2} w^{1118} P\{ey-FLP.N\}2$ $P\{GMR-lacZ.C(38.1)\}TPN1;$ $P\{neoFRT\}40A$	Bloomington stock center#5615
Ifc-KO,FRT40A	$w^{1118}; ifc-KO, P\{neoFRT\}40A/ CyO-GFP$	本實驗室製備
<i>Tub-Gal4</i>	$y^1 w^*$; $P\{tubP-GAL4\}LL7 /TM3, Sb1 Ser1$	Bloomington stock center#5138
<i>repo-gal4</i>	$w^{1118}; P[GAL4]repo/TM3, Sb^1$	Bloomington stock center#7415
UAS- <i>ifc</i>	$y^1 w^*$; UAS- <i>Ifc</i>	本實驗室製備
UAS- <i>ifc-mCherry</i>	$w^{1118}; P\{UAS-ifc-mCherry\}3$	本實驗室製備
GMR- <i>myr-mRFP</i> , FRT40A	$ey-FLP; GMR-myR-mRFP, FRT40A$	Bloomington stock center #7122
<i>rdhB-Gal4</i>	$P\{rdhB-GAL4.W\}1, w^{1118}; snaSco/CyO;$ TM2/MKRS	Bloomington stock center #24501
<i>spa-Gal4</i>	$P\{w[+mC]=spa-GAL4.J\}1, w[*]$	Bloomington stock center #26656
Flo2-YFP	$y1 w^{1118} Flo2-YFP$	DGRC#120561
Rab4-EYFP	$y1 w^{1118}; TIRab4EYFP$	Bloomington stock center #62542
Rab11-EYFP	$w[1118]; TIRab11[EYFP]$	Bloomington stock

		center #62549
<i>DE-Gal4</i>	y1 w*; wgSp-1/CyO; P{GawB}mirrDE/TM3, Sb ¹	Bloomington stock center #29650

2.2 果蠅食物培養基製備

1L 食物所需材料

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

以上材料放進鍋中後加熱並持續攪拌至沸騰，待降溫至攝氏 70 度後，加入防腐劑 10mL 及營養劑 8.08mL

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

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

2.3 視神經電位紀錄(Electroretinogram)

先將每組 10 隻之果蠅左半側，以無毒性白膠小心固定至載玻片上，並確保未碰觸右半邊之眼睛，再將玻片移至黑暗處並待膠水風乾。在紀錄時，先以 2M NaCl 溶液裝滿玻璃紀錄電極及接地電極。紀錄電極輕觸右半部眼睛，接地電極則插入第二體節之柔軟處。光刺激為電腦軟體所控制，強度固定為 3000 Lux 並持續一秒。

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記錄器連接，再將後者和訊號分配放大器 (intracellular electrometer IE-210) 連接，以將電訊號轉為數位訊號。除此之外，IE-210 接地且紀錄時皆在銅網內進行，以避免雜訊干擾。使用 Lab scribe2 做數據分析，每一基因型至少使用 15 隻果蠅，每隻果蠅至少做出五個波形，以選出最具代表性之波形。



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:

Pressure=500

Heat: 572, Pull=35, Vel=20, Del=100

Heat: 520, Pull=30, Vel=20, Del=100

Heat: 520, Pull=30, Vel=20, Del=100

Heat: 520, Pull=25, Vel=15, Del=100

Heat: 500, Pull=20, Vel=10, Del=100

Heat: 490, Pull=20, Vel=10, Del=100

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

果蠅視神經免疫螢光染色

將成蟲果蠅眼睛於一倍磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS) 中解剖分離，於多聚甲醛 (PBS 含 4% paraformaldehyde) 中固定二十分鐘，而後以 PBST 緩衝液 (PBS 含 0.4% Triton X-100) 清洗三次，每次十分鐘，在攝氏四度環境下再以含螢光標定鬼筆環肽 (Alexa Fluor 488® phalloidin; 標定 F-actin) 之 PBST 緩衝液 (濃度 1:500) 染色隔夜 (12-16 小時)，之後以 PBST 緩衝液 (PBS 含 0.4% Triton X-100) 清洗三次，每次十分鐘，最後以 VECTASHIELD® Mounting Media 和指甲油封片。

果蠅幼蟲眼碟細胞染色

將果蠅三齡幼蟲的眼碟於一倍磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS) 中解剖分離，於多聚甲醛 (PBS 含 4% paraformaldehyde) 中固定十八分鐘，而後以 PBST 緩衝液

(PBS 含 1% Triton X-100) 或 1X PBS 緩衝液(不破膜的條件)清洗三次,每次十分鐘,在攝氏四度環境下以含一抗之 1% PBST 緩衝液或 1X PBS 緩衝液染色一天 (24 小時),之後以 1% PBST 緩衝液 1X PBS 緩衝液清洗三次,每次十分鐘,再以含二抗 (濃度 1:500) 之 1% PBT 緩衝液 1X PBS 緩衝液染色隔夜 (12-16 小時),之後以 1% PBST 緩衝液 1X PBS 緩衝液清洗三次,每次十分鐘,最後以 VECTASHIELD® Mounting Media 和指甲油封片。

LipidTox 染色

將成蟲果蠅眼睛於一倍磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS) 中解剖分離,於多聚甲醛 (PBS 含 4% paraformaldehyde) 中固定二十分鐘,而後以 PBST 緩衝液 (PBS 含 0.05% Triton X-100) 清洗三次,每次十分鐘,在攝氏四度環境下再以含螢光標定鬼筆環肽 (Alexa Fluor 647® phalloidin;標定 F-actin) 之 PBST 緩衝液 (濃度 1:500) 染色隔夜 (12-16 小時),之後以 1X PBS 緩衝液清洗三次,每次十分鐘,在攝氏四度環境下再以 LipidTOX Deep Red (Thermo Fisher, H34477)(濃度 1:200) 染色隔夜 (12-16 小時),之後以 1X PBS 緩衝液清洗三次,每次十分鐘,最後以 VECTASHIELD® Mounting Media 和指甲油封片。

in vivo 活性氧物種 (ROS) 偵測 - CMH₂DCFDA 染色 (modified from Owusu-Ansah et al)

將成蟲果蠅眼睛於一倍磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS) 中解剖分離,而後以 10 uM/30 uM (CMH₂DCFDA; ThermoFisher, cat no. D-399) 重組染劑於黑暗中染色五分鐘,以一倍磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS) 清洗三次,每次五分鐘,最後立刻以 VECTASHIELD® Mounting Media 和指甲油封片,並在染色當天利用共軛焦顯微鏡擷取影像。



共軛焦顯微鏡使用

顯微鏡型號: Leica TCS SP5

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

實驗所使用物鏡(Lens): 10X, 20X(oil), 40X(oil)

影像擷取軟體: LAS AF

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

影像處理(Image processing)

影像亮度 (Intensity) 與對比 (Contrast) 調整於 Adobe Photoshop CS6 軟體中進行, 影像之顏色轉換 (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 免疫染色抗體清單(IHC Antibody List)

一抗			
抗體名稱	抗原	來源	染色濃度
anti-Ifc	N-CDFPAVPGSRLPEVKR-C Ifc 胺基酸序列第 264 至 278 個胺基酸	實驗室製備	1:200
Anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	ATPase, (Na ⁽⁺⁾ K ⁽⁺⁾) alpha subunit	DSHB#a5s	1:200
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	F-actin	Life Technologies#A123 79	1:500
Alexa Fluor® 647 Phalloidin	F-actin	LifeTechnologies #A22287	1:500

Rab5		Abcam	1:200
Rab7		實驗室製備	1:100
Atg8a	GABARAP	Abcam	1:200
Anti-Bip		StressMarq	1:200
Anti-GM130		Abcam	1:200
Anti-LAMP1		Abcam	1:200
Anti-Rh1	Rhodopsin	DSHB# 4F3	1:200
Anti-Chaoptin	Chaoptin	DSHB#24B10	1:200
Anti-Retinal space	Retinal space (Eyes shut)	DSHB#21A6	1:200
Anti-NECD	Notch, extracellular domain, EGF repeats #12-20	DSHB#C458.2H	1:200
Anti-DLG	Discs large	DSHB# 4F3	1:200

二抗		
抗體名稱	來源	染色濃度
Anti-rabbit IgG Cy3	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
Anti-rabbit IgG AF647	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
Anti-rabbit 488	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
Anti-mouse 405	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
Anti-mouse 488	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500
Anti-mouse 647	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:500

2.6 群組分析(Clonal analysis)

利用果蠅的 FRT-FLP 方法(Xu and Rubin 1993)特定於眼睛製作 *ifc* 突變細胞

群組(mutant clone)。

ifc-KO 突變群組

1. Cell lethal eye clone: 以 *ey*-FLP; cell lethal, FRT40A/CyO-GFP 處女果蠅與 *ifc*-KO, FRT40A/CyO-GFP 公果蠅交配。子代選用 *ey*-FLP; cell lethal, FRT40A/*ifc*-KO, FRT40A。
2. GMR-myr-mRFP eye clone: 以 *ey*-FLP; GMR-myr-mRFP, FRT40A 處女果蠅與 *ifc*-KO, FRT40A/CyO-GFP 公果蠅交配。子代選用 *ey*-FLP; GMR-myr-mRFP, FRT40A/*ifc*-KO, FRT40A。

2.7 果蠅餵食藥劑實驗製備

將抗氧化劑-AD4 (4mg/mL, Sigma-aldrich) 與鞘氨醇-1-磷酸 (S1P) 拮抗劑-fingolimod (4mg/mL, Cayman) 加入正常果蠅食物中使藥劑最終濃度為 40 μ g/mL。雷帕黴素 (Rapamycin; LC laboratories) 溶於酒精 (EtOH) 並且加入正常果蠅食物使藥劑最終濃度為 20 μ M。3-甲基腺嘌呤 (3-MA; Sigma-aldrich) 溶於水後 (10 mM) 再與蔗糖溶液混合，可得溶液濃度為 8mM 的 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 與 3.25% 蔗糖溶液，而後將混合溶液加在拭鏡紙 (Kimwipes) 上進行藥物餵食。將 Apocynin(Sigma-aldrich)溶於 DMSO 後加入蔗糖溶液使藥劑最終濃度為 10 mM/mL，而後將混合溶液加在拭鏡紙上進行藥物餵食。



第三章

實驗結果

3.1 在果蠅視神經失去 *ifc* 造成漸進式活性細胞退化

為瞭解 *ifc* 在生物體內之功能，實驗室利用 CRISPR/Cas9 技術建立 *ifc* 基因剔除果蠅，並發現此 *ifc* 基因剔除同型合子果蠅於約二齡幼蟲時死亡，為了確認 *ifc*-KO 在二齡幼蟲時死亡是由於失去 *ifc* 所導致，我們利用全身性表現的 *tub-Gal4* 過表達 UAS-*ifc*-cDNA，發現能拯救 *ifc*-KO 的死亡與發育缺陷，顯示 *ifc* 對於果蠅的正常發育扮演重要角色，而後利用不同 Gal4 過表達 *DEGS1* 來拯救 *ifc*-KO，證明 *ifc* 在神經上的功能與其人類同源基因 *DEGS1* 具有演化上的保守性(Jung, Liu et al. 2017)。

由於具 *ifc*-KO 等位基因的果蠅其同型合子在二齡幼蟲時即死亡，故為了瞭解 *ifc* 對於神經發育及神經退化上的調控，我們進行 clonal analysis，特定在異型合子果蠅的眼睛製作 *ifc* 同型合子突變細胞 (*ifc*-KO/*ifc*-KO) 以瞭解細胞結構之改變。利用 *eyFLP* 在眼睛產生 *ifc*-KO 的同型合子的細胞與 GMR-*myr*-RFP 標定之正常細胞，發現照光 10 天之果蠅其眼睛外觀正常，經螢光標記鬼筆環肽 (phalloidin;標定 F-actin) 及 Na⁺/K⁺ ATPase (標定神經細胞膜) 染色後，以免疫螢光染色實驗確認其內部之視神經細胞形態，發現失去 *ifc* 之細胞相較於以 *myr*-RFP 標定之控制組細胞有退化的情形(Fig.1A-1A'')，*ifc*-KO 細胞其神經細胞膜出現不規則狀或萎縮之型態，且其桿狀小體數目相較控制組有顯著下降的情形 (Fig. 1B)，因此推論失去 *ifc* 會導致活性依賴 (activity-dependent) 的神經退化，而因為 *eyFLP* 作用涵蓋視神經細胞以及周圍少部分神經膠細胞，故需進一步探討 *ifc* 在神經細胞與神經膠細胞之功能以及是否為細胞自主性(cell autonomy)。

3.2 在果蠅視神經失去 *ifc* 造成脂噬作用增加

先前研究得知在神經磷脂質生合成路徑中，*Ifc* 為 Dihydroceramide desaturase 負責將 DHCer 轉換為 Cer，實驗室透過與藥學系郭錦樺老師實驗室合作，確認失去 *ifc* 會導致上游 DHCer 堆積以及下游 Cer 減少，因此推論 DHCer 堆積可能是

造成 *ifc*-KO 果蠅視神經細胞退化之原因(Jung, Liu et al. 2017)，目前已知當細胞內的脂質過多時，細胞會藉由自噬小體吞噬油滴，與溶酶體結合後清除油滴，此現象稱為脂噬作用(Lipophagy)(Weidberg, Shvets et al. 2009)，為了檢視失去 *ifc* 後，細胞是否會藉由脂噬作用來清除堆積之脂質，我們利用 clonal analysis，以 GMR-myr-RFP 標定果蠅視神經正常細胞，反之無 RFP 訊號則為 *ifc*-KO 細胞，經照光 3 天後，利用 LipidTOX 標定中性油滴與 Atg8a 共染，觀察 LipidTOX 與 Atg8a 共位(colocalization)之情形(代表脂噬作用)，實驗結果發現，在照光 5 天的實驗條件下，*ifc*-KO 細胞其 LipidTOX 與 Atg8a 訊號相較於控制組有提升，且兩者之共位程度亦較控制組高(Fig. 2)，故推論失去 *ifc* 後會誘導果蠅視神經細胞之脂噬作用提升，但我們沒有觀察到 DHCer-dependent 之脂噬作用，因此失去 *ifc* 後為何會造成中性脂質堆積亦為未來研究探討之方向。

3.3 在果蠅視神經失去 *ifc* 會導致 Rh1 堆積在 Atg8a 相關胞器

已知神經脂質之恒定會調控細胞內膜運輸，且失去 *ifc* 後會導致果蠅視神經產生活性依賴退化，目前研究指出，視神經活性依賴退化與光傳遞路徑上之特定蛋白運輸有關，例如 Rh1, Crb 等等(Reinke, Krantz et al. 1988, Chinchore, Mitra et al. 2009, Gurudev, Yuan et al. 2014)，因此我們以 *eyFLP* 產生全視神經剔除 *ifc* 之果蠅 (*ifc*-KO whole eye clone)，藉由連續照光 3 天之刺激，觀察特定蛋白的運輸是否正常。實驗結果顯示失去 *ifc* 後 Rh1 會堆積在 Atg8a 標定之胞器內(Fig. 3)，透過 Rh1 與 BiP(標定內質網)與 GM130(標定高基氏體)之共染，發現 Rh1 並無堆積在內質網與高基氏體，故我們排除失去 *ifc* 對 Rh1 的製造與修飾之影響，且 Rh1 亦無堆積在內容酶體路徑中，故推論照光會誘導 Rh1 經由內質網生成後運送至高基氏體修飾，接著送至細胞膜上活化，後經由內吞作用運送至內體與溶酶體融合進行降解。實驗室先前已證明失去 *ifc* 後會導致細胞自噬作用提升，且此自噬小體可與溶酶體融合進行降解作用(Jung, Liu et al. 2017)，但失去 *ifc* 後部分 Rh1 仍

堆積在自噬小體中無法順利降解。



3.4 在果蠅視神經失去 *ifc* 會造成 Choptin 堆積，但不影響 Eyes shut

為了確定失去 *ifc* 是否只影響 Rh1 之運輸，我們觀察了果蠅視神經內其他蛋白質之表現，目前已知果蠅視神經細胞中，Chp 與 Eys 參與果蠅視神經細胞的型態演化(morphogenesis)。Chp 表現在視神經細胞內，經由粗糙內質網微粒體膜生成，運送至 basolateral membrane，與 Crb 協助桿狀小體黏附，而 Eys 則藉由 stalk membrane 分泌至 IRS 中，分隔各個桿狀小體，我們在照光 3 天後之 *ifc*-KO 果蠅視神經中觀察到 Chp 堆積，但不影響 Eys 分佈(Fig. 4)，顯示失去 *ifc* 導致 Rh1 與 Chp 運輸失常，但不影響視神經細胞早期發育時 Eys 的分泌。

3.5 減少 Rh1 表現會恢復失去 *ifc* 後產生的漸進式神經退化

為了確認 Rh1 堆積造成 *ifc*-KO 果蠅視神經之活性依賴退化，我們利用 *rhl* 無性突變(amorphic mutation)來觀察減少 *rhl* 之表現是否能拯救 *ifc*-KO 果蠅在照光 3 天後所產生的活性依賴退化。實驗結果顯示在 *ifc*-KO 果蠅中降低 *rhl* 表現可以部分恢復因為失去 *ifc* 所造成的桿狀小體數目減少(Fig. 5A-A',B)與視神經電位下降之情形(Fig. 5C)，代表降低 *rhl* 表現在形態與功能上皆能部分恢復失去 *ifc* 所產生的缺陷。綜合以上結果，推論失去 *ifc* 會影響細胞膜上特定蛋白的運輸，導致在光刺激下造成 Rh1 堆積。

3.6 餵食 Apocynin 抑制 NOX 會恢復 *ifc*-KO 造成的神經退化與降低 ROS

實驗室發現在連續照光 3 天後 *ifc*-KO 果蠅視神經相較於控制組有 ROS 增加之現象(Jung, Liu et al. 2017)，且利用餵食抗氧化劑 N-乙醯-L-胱氨酸(AD4)可降低 ROS 拯救 *ifc*-KO 之退化，故推測 ROS 增加為導致 *ifc*-KO 果蠅視神經活性依賴退化之原因。已知光會刺激 Rac1 活性 (Balasubramanian and Slepak 2003,

Belmonte, Santos et al. 2006), Rac1 活化導致 NOX 作用產生 ROS(Sundaresan, Yu et al. 1996, Jaffe and Hall 2005), 而為了釐清光照與 ROS 增加之關聯性, 我們利用餵食 Apocynin 來抑制果蠅的 NOX 活性, 藉由抑制 NOX 作用來觀察 *ifc*-KO 果蠅之 ROS 是否經由 NOX 生成。實驗結果顯示餵食 Apocynin 抑制 NOX 活化可以部分恢復失去 *ifc* 所產生的視神經電位下降之情形(Fig. 6A-A'), 且 ROS 增加之情形亦被反轉(Fig. 6B-B'), 推論 NOX 為 *ifc*-KO 果蠅視神經活性退化中 ROS 生成之主要來源。

3.7 果蠅神經膠細胞表現 *Ifc*-mCherry 會出現在視神經細胞

實驗室先前利用不同 Gal4 過表達 *Ifc*-mCherry 來拯救失去 *ifc* 後產生的致死性(lethality), 結果顯示在不同組織產生的 *Ifc*-mCherry 會對 *ifc*-KO 之致死性有不同程度之恢復 (Jung, Liu et al. 2017), 推論不同組織過表達的 *Ifc*-mCherry 可能為細胞非自主機制(cell non-autonomous activity)故皆可拯救 *ifc*-KO 之致死性, 因此為了確認 *Ifc* 是否可以在不同組織間運送, 我們在以神經膠細胞(*repo*-Gal4)過表達 *Ifc*-mCherry 拯救 *ifc*-KO 致死性之果蠅(*ifc*-KO ; *repo*>UAS-*ifc*-mCherry)以及色素細胞(*rdhB*-Gal4)或錐細胞(*spa*-Gal4)過表達 *Ifc*-mCherry 之果蠅中, 觀察 *Ifc*-mCherry 是否會出現在視神經細胞內。結果在視神經細胞內確實偵測到由神經膠細胞、色素細胞或錐細胞所產生之 *Ifc*-mCherry 訊號(Fig. 7), 顯示 *Ifc*-mCherry 具有離開製造細胞之能力, 因此可能為細胞非自主機制作用蛋白。

3.8 *Ifc* 與內生性 Rab4 共位

為了解 *Ifc* 離開製造細胞的運輸機制, 我們首先觀察 *Ifc* 是否會經由再循環內體運送至細胞膜, 已知 Rab4 與 Rab11 皆參與細胞中再循環內體運輸(Lock and Stow 2005, D'Angelo, Matusek et al. 2015), 故我們利用內生性 Rab4-EYFP 或 Rab11-EYFP 標定再循環內體, 在此兩株果蠅視神經中以免疫螢光染色觀察內生

性 Ifc 是否會與 Rab4-EYFP 或 Rab11-EYFP 訊號共位，我們發現 Ifc 出現在 Rab4 所標定之循環內體而不在 Rab11 之再循環內體上(Fig. 8)。



3.9 在果蠅三齡幼蟲眼碟細胞外之 Ifc 位於 Rab4-EYFP 相關之囊泡

前人研究指出 Rab4 可能位於外吐小體上(Gross, Chaudhary et al. 2012)，而我們的實驗結果顯示在果蠅視神經細胞中 Ifc 與 Rab4 共存，因此我們在果蠅三齡幼蟲的眼碟上以不破膜(無界面活性劑)之條件進行免疫螢光染色，並以 Notch extracellular domain (NECD)標定細胞膜外區域，觀察 Ifc 是否位於內生性 Rab4-EYFP 標定之外吐小體，結果顯示部分 Ifc、Rab4-EYFP 與 NECD 共位(Fig. 9)，確認在細胞外 Ifc 位於 Rab4 標定之外吐小體上。

3.10 Ifc 位於 Flo2-EYFP 相關之囊泡

為了更進一步檢測 Ifc 位於外吐小體，我們首先尋找其他外吐小體標誌來觀察其與 Ifc 的共位現象。Flotillin 1/2 (Flo2/1)為 microdomain-associated 蛋白，其人類同源基因為 *reggie 2/1*，最初在 caveolae 膜上被發現(Bickel, Scherer et al. 1997)，後來亦在次級內體膜(Fivaz, Vilbois et al. 2002)以及大鼠和人類網狀紅血球細胞釋出之外吐小體中發現(de Gassart, Geminard et al. 2003)，目前常用來標定脂筏與外吐小體。我們利用免疫螢光染色觀察 Ifc 在 Flo2-EYFP 果蠅視神經中是否共位，結果顯示內生性的 Ifc 位於 Flo2-EYFP 所標定之 vesicle (Fig. 10A-A’’’)，且無論是視神經細胞或錐細胞與色素細胞皆有觀察到此共位現象。而為了更確認此結果，我們利用 *tub-Gal4* 在 Flo2-EYFP 果蠅中全身性表達 Ifc-mCherry，實驗結果顯示過表達之 Ifc-mCherry 亦會與 Flo2-EYFP 訊號共位(Fig. 10B-B’’’)。

3.11 果蠅三齡幼蟲眼碟細胞之 Ifc-mCherry 與 mCD8::GFP 可離開製造細胞

由實驗結果得知，在神經膠細胞、錐細胞與色素細胞過表達 Ifc-mCherry 會

在視神經細胞中偵測到此訊號，且 Ifc 位於 Rab4-EYFP 或 Flo2-EYFP 所標定之 vesicle 上。先前研究指出外吐小體富含 ceramide，而抑制 neutral sphingomyelinase 會促使外吐小體釋放減少，顯示 ceramide 可能為外吐小體釋放作用之調控因子 (Trajkovic, Hsu et al. 2008)，因此我們推論過表達 Ifc 應會促使外吐小體釋放作用增加。前人研究建立 Dorsal-Eye Gal4 果蠅株，表現位置在果蠅幼蟲眼碟背側 (Morrison and Halder 2010)，故我們希望以 *DE-Gal4* 過表達 Ifc-mCherry 在果蠅眼碟細胞中建立一個易於觀察外吐作用之系統，在 *DE-Gal4* 過表達 Ifc-mCherry 與 mCD8::GFP 後觀察 Ifc-mCherry 是否會離開 mCD8::GFP 所標定之製造細胞，並以 DLG 標定細胞邊界 (Figure. 6)，結果顯示 Ifc-mCherry 會離開 mCD8::GFP 所標定之製造細胞，其距離大約為 6~8 個細胞 (Fig. 11)，除此之外，亦觀察到 mCD8::GFP 出現在非 *DE-Gal4* 表達之區域，顯示在過表達 Ifc-mCherry 之背景下，可能會促使 mCD8::GFP 離開其製造細胞。

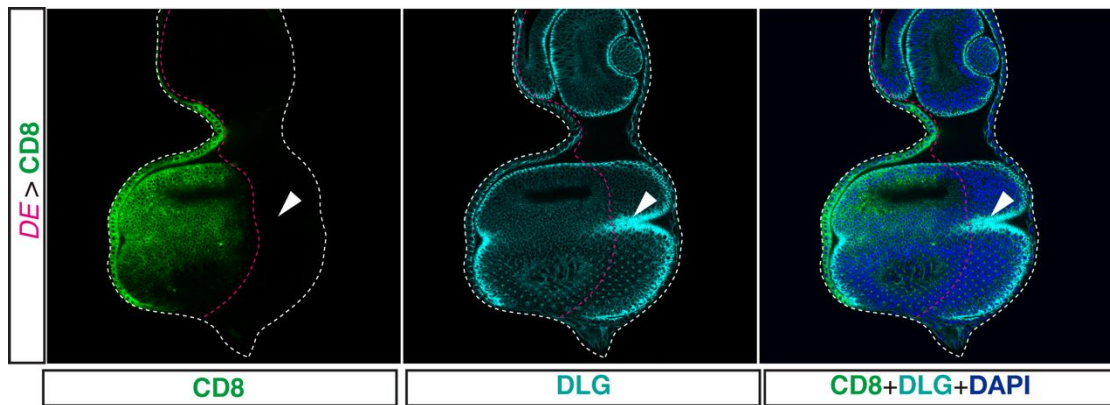


Figure. 6 *DE>mCD8::GFP* 模式圖，紫紅色虛線左側 mCD8::GFP 區域表示 *DE-Gal4* 表現區域，箭頭表示 *DE-Gal4* 未表現區域，我們將觀察 Ifc-mCherry 訊號是否出現在此區域。



第四章

實驗討論


4.1 *ifc* 為細胞非自主機制及其在神經細胞與神經膠細胞之功能

我們利用 *eyFLP* 在果蠅視神經中進行 *ifc-KO* 群組分析，在照光 5 天條件下，我們觀察到 *ifc-KO* 細胞出現神經細胞膜不規則萎縮及桿狀小體數目減少之型態退化，而 *myr-RFP* 標定之控制組細胞則無，結果顯示失去 *ifc* 會導致果蠅視神經活性退化且無法被周圍控制組細胞拯救，我們推測有兩種原因會導致此現象，(1)*Ifc* 為細胞自主機制，無法離開製造細胞或遠端調控非製造細胞之蛋白作用 (2)*Ifc* 為細胞非自主機制，但控制組細胞內生性表現量不夠，無法額外拯救 *ifc* 基因剔除細胞。但在視神經細胞中觀察到錐細胞或色素細胞過表達之 *Ifc-mCherry* 訊號，且發現 *Ifc* 位於 *Rab4* 相關之外吐小體(exosome)，並在果蠅三齡幼蟲眼碟上觀察到 *Ifc-mCherry* 及 *mCD8::GFP* 離開製造細胞，由以上實驗結果，推測 *ifc* 可離開製造細胞產生細胞非自主機制之作用，但在 *ifc-KO* 群組分析中，控制組細胞是否因為內生性表現量不足而無法拯救 *ifc-KO* 細胞退化則需進一步實驗釐清。

eyFLP 作用涵蓋視神經細胞以及周圍少部分神經膠細胞，故需討論 *ifc-KO* 全感光細胞突變群組活性依賴退化是來自神經細胞或神經膠細胞失去 *ifc* 之緣故。我們觀察到神經膠細胞、錐細胞與色素細胞過表達之 *Ifc-mCherry*，會堆積在視神經細胞外，少部分訊號會進入視神經細胞內，且前人研究指出錐細胞與色素細胞為分泌型細胞，當其細胞分泌功能失常可能會導致視神經細胞發育不良或死亡，但詳細機制目前尚須釐清(Cagan 2009)，因此我們無法排除觀察到的視神經活性退化是起因於神經膠細胞失去 *ifc* 之可能性。

4.2 *ifc* 與細胞膜上的蛋白運輸之調控

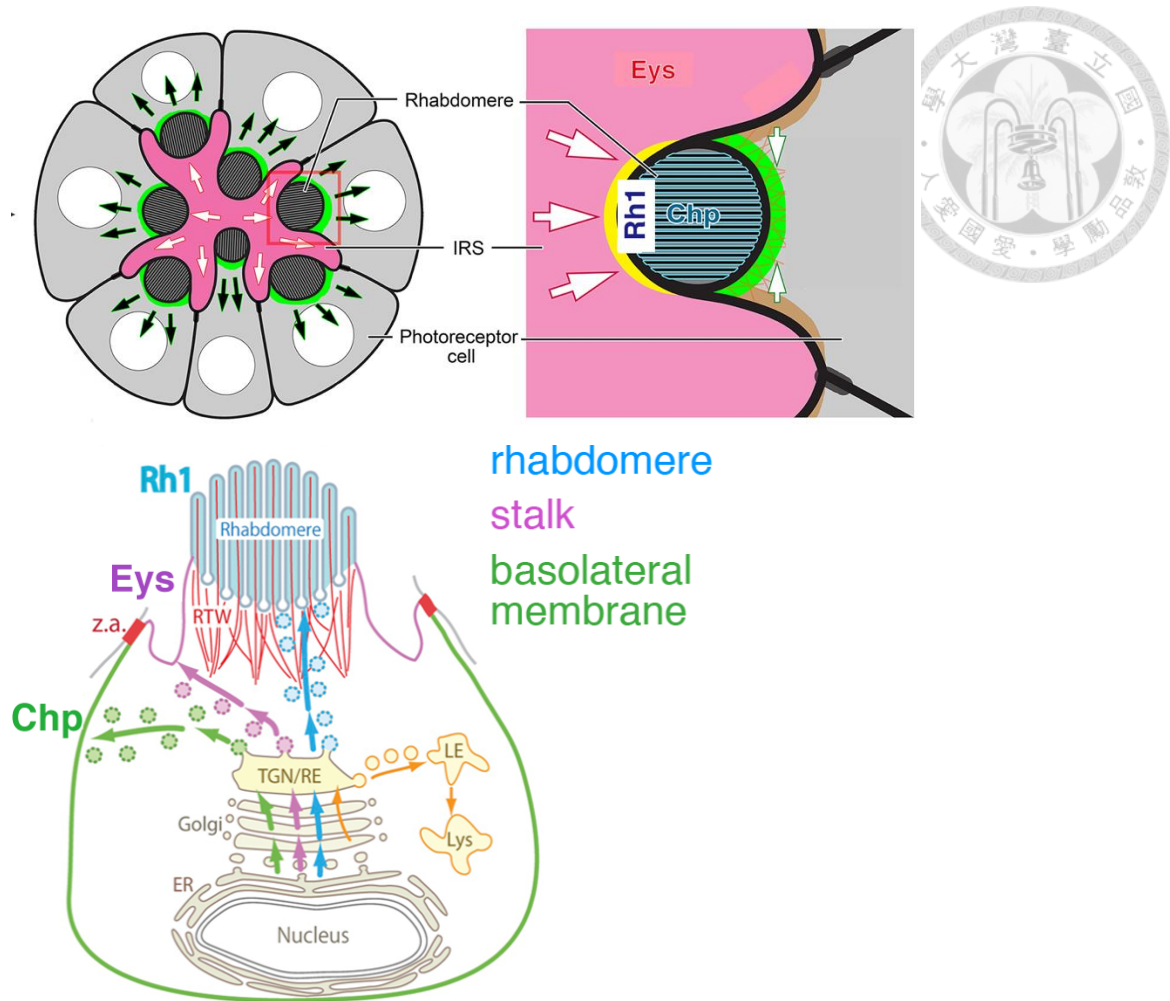
我們發現在 *ifc-KO* 全感光細胞突變群組中 *Rh1* 與 *Chp* 蛋白堆積，但 *Eys* 分布則不受影響，且觀察到 *Rh1* 堆積在自噬小體中。先前研究已知 *Rh1*,*Chp* 與 *Eys* 皆由 ER 製造運送至 Golgi 修飾，*Rh1* 會被運送至桿狀小體接受光刺激活化後內



吞至溶酶體或自噬小體降解，而 Chp 則被運送至 basolateral membrane 調控桿狀小體型態演化，Eys 經由 stalk membrane 送至 inter-rhabdomeric space(IRS)分隔小眼中各個桿狀小體(Iwanami, Nakamura et al. 2016)，少部分 Eys 與 stalk membrane 重疊，大部分蛋白則聚集在 IRS(Husain, Pellikka et al. 2006)(Figure. 7)，上述實驗結果顯示此三種蛋白質的生成不受影響，我們推測失去 *ifc* 之所以造成 Rh1 與 Chp 堆積但不影響 Eys 分佈，可能為以下原因：(1)Ifc 調控的時期較晚，在果蠅眼睛發育中，早期可能先分泌 Eys 至 IRS 後，晚期再運送 Rh1 與 Chp 至 rhabdomere 與 basolateral membrane，使視神經細胞產生極性與型態演化。(2)失去 Ifc 影響膜的組成，造成穿膜蛋白運輸缺陷，相較於 Rh1 與 Chp 作用在膜上，Eys 大部分位於 IRS 分隔桿狀小體，故推測較無影響。(3)此三種蛋白的運輸機制不同，失去 Ifc 影響的運輸機制參與 Rh1 內吞後運送之自噬小體與 Chp 運送至 basolateral membrane 之過程，Eys 則藉由另一內體運輸。

另外，我們觀察到 Ifc 位於 Rab4 或 Flo2 所標定的外吐小體上，推測失去 *ifc* 造成 Cer 減少可能抑制外吐小體分泌作用，若假說為真，則可能造成所有必須分泌出去的 cargoes 堆在 MVBs，連帶影響被內吞進來的 Rh1 與 Chp 運輸。但受限於抗體的製造來源皆為老鼠，我們無法將 Na⁺/K⁺ ATPase (標定神經細胞膜)分別與 Rh1 或 Chp 共染，確認 Rh1 與 Chp 堆積在細胞內。

在 *ifc-KO* 全感光細胞突變群組顯示活性依賴退化，而先前研究顯示 Rh1 堆積是造成活性依賴退化的原因之一，在 *ifc-KO* 全感光細胞突變群組之果蠅中放入 *rh1* null mutant 異型合子減少 *rh1* 表現可以使神經細胞免於退化，顯示 Rh1 堆積是造成神經死亡的原因，而前人研究指出失去 *chp* 會導致微絨毛不規則聚集的形態異常，但無視神經活性依賴退化之現象，但無結果排除 Chp 堆積不會造成神經死亡，故我們需要進一步檢定 Chp 堆積是否為 *ifc-KO* 全感光細胞突變群組活性依賴退化的原因。



adapted from (Nie, Mahato et al. 2014, Iwanami, Nakamura et al. 2016)

Figure. 7 果蠅視神經細胞內 Rh1,Eys 與 Chp 之運輸

4.3 失去 *ifc* 產生的活性依賴退化與 Rac1-NOX pathway 之關係

我們餵食 *ifc*-KO 全感光細胞突變群組之果蠅 Apocynin 以抑制 NOX 作用，發現能部分恢復失去 *ifc* 所產生的視神經功能退化與 ROS 堆積之情形，顯示 NOX 所產生之 ROS 為 *ifc*-KO 活性退化之原因。先前哺乳類研究發現 Rac1 受光刺激活化後促使 NOX 產生 ROS，而果蠅的視神經細胞中 Crb 可透過抑制 Rac1-NOX pathway 來調控 ROS 生成，因此我們需要釐清失去 *ifc* 是否會影響 Crb 蛋白運輸，造成 Crb 失常，進而導致 Rac1-NOX pathway 過度活化產生 ROS 堆積，或者，*ifc* 為另一獨立調控 Rac1-NOX pathway 的因子。

先前實驗室利用穿透式電子顯微鏡 (TEM) 進行 *ifc*-KO 成蟲果蠅視神經超微結構分析，發現給予光刺激 3 天的 *ifc*-KO 視神經細胞內粒線體並無外觀與結構上之異常，故推測 ROS 堆積並非起因於粒線體缺陷(Jung, Liu et al. 2017)。目前已知哺乳類中 NOX 為穿膜蛋白，且其細胞內作用位置可能依不同細胞型態而有所差異(Panday, Sahoo et al. 2015)，故尚需實驗確認果蠅視神經中 NOX 位置與排除失去 *ifc* 對粒線體功能之影響。

4.4 *ifc* 與 Rab4 調控之外吐小體的關係

我們在視神經細胞中偵測到錐細胞或色素細胞產生之 *Ifc*-mCherry 訊號，顯示 *Ifc* 可以離開製造細胞，且發現細胞外的 *Ifc* 與 Rab4 共位，先前果蠅研究證實 Rab4 可作為細胞外吐小體之標誌(Gross, Chaudhary et al. 2012)，故我們推測 *Ifc* 可能藉由 Rab4 調控之外吐小體運輸到其他作用細胞，需進一步以實驗證實此假說。

我們以 *DE*-Gal4 在果蠅三齡幼蟲眼碟背側細胞過表達 *Ifc*-mCherry 與 mCD8::*GFP*，發現 *Ifc*-mCherry 與 mCD8::*GFP* 分別出現在非 *DE*-Gal4 所表現的細胞，此結果再次顯示 *Ifc* 可被運送至其他細胞，且過表達 *Ifc* 會影響細胞膜上 mCD8::*GFP* 之分泌。先前研究指出，細胞除了分泌細胞外囊泡運送 signaling 蛋白之外，亦可能藉細胞內肌動蛋白絲聚集成束來延伸細胞膜，形成特化的絲狀偽足構造 cytoneme，由製造細胞直接延伸 cytoneme 至接受細胞來運送 signaling 蛋白(Ramirez-Weber and Kornberg 1999)，因為我們以 DLG 標定細胞界線，並沒有觀察到延伸之細胞膜，且 *Ifc*-mCherry 出現在離製造細胞約 6~8 個細胞遠，故我們排除 *Ifc*-mCherry 藉 cytoneme 運送之可能



第五章

未來實驗方向



5.1 探討在視神經細胞或神經膠細胞失去 *ifc* 對果蠅視神經存活之影響

在目前的研究中，我們以 *eyFLP* 製造 *ifc-KO* 全感光突變群組，並發現此株果蠅在光刺激下會產生活性依賴退化，但因為 *eyFLP* 作用範圍涵蓋視神經細胞與少部份周圍神經膠細胞，因此我們需要探討此退化現象是起因於神經失去 *ifc* 或是神經膠細胞失去 *ifc*，釐清 *ifc* 在神經與神經膠細胞中何者較重要，我們會利用 *ey3.5FLP* 與 *repo-FLP* 分別在視神經與神經膠細胞製造 *ifc-KO* 突變群組，測試其視神經型態與功能是否出現退化現象。再來，我們想釐清 *ifc-KO* 群組分析中，控制組細胞是否因為內生性表現量不足而無法拯救 *ifc-KO* 細胞退化，因此我們利用 *ey3.5FLP* 在視神經中建立 *ifc-KO* 突變群組，在神經膠細胞(如:*repo-Gal4*、*spa-Gal4*)過表達 *Icf-mCherry*，預期能拯救失去 *ifc* 後的視神經功能活性退化現象，並觀察 *Icf-mCherry* 是否出現在視神經細胞內，以證明周圍細胞可利用細胞非自主機制來調控過表達的 *Icf-mCherry* 拯救 *ifc-KO* 視神經細胞活性退化。

5.2 探討 *ifc* 與 *rab4* 調控的外吐小體之交互作用

我們初步觀察到過表達的 *Icf-mCherry* 與外吐小體標誌 *Rab4* 或 *Flo2* 共位，且發現 *Icf-mCherry* 可以被分泌到細胞外，亦造成 *mCD8::GFP* 離開製造細胞，這些結果暗示 *ifc* 可能扮演調控視神經細胞外吐作用的角色，當 *ifc* 過表達時，細胞可能傾向進行外吐作用，我們需要設計實驗證明此假說，首先，我們會以 *DE-Gal4* 過表達 *Icf-mCherry* 與外吐小體螢光標誌蛋白(如 *Rab4-YFP* 或 *CD63-GFP*)，我們預期在 *ifc* 過表達的情況下，*Rab4-YFP* 或 *CD63-GFP* 的螢光訊號將會出現在非 *DE-Gal4* 表現的區域，代表 *ifc* 過表達可促使外吐小體分泌，且 *Rab4-YFP* 或 *CD63-GFP* 的螢光訊號相較於未過表達 *ifc* 的控制組可能會增加。再來，我們想要探討細胞內 *Icf* 與 *Rab4* 是否位於同一個 complex，且 *Rab4* 的 GTPase 活性是否影響 *Icf* 與 *Rab4* 的作用，因此將果蠅分成三組，以 *elav-Gal4* 在神經過表達

Rab4-WT-YFP、Rab4-CA-YFP 與 Rab4-DN-YFP，取果蠅頭部以免疫沉澱法 (Immunoprecipitation, IP) 分析 Ifc 與 Rab4 之作用機制。最後，我們會製造 *ifc-KO, rab4-KO* 之果蠅株，利用 *ey3.5FLP* 產生全感光突變群組，若同時失去 *ifc* 與 *rab4* 會使原先觀察到的 *ifc-KO* 視神經活性依賴退化加劇，則我們推測 *ifc* 與 *rab4* 有交互作用。

5.3 探討 *ifc* 對果蠅視神經中外吐小體生成與分泌的調控

ifc 是否影響多泡體生成外吐小體

外吐小體的起源來自多泡體生成的管腔內囊泡，目前已知多泡體生成管腔內囊泡的機制分為 ESCRT 調控與 ceramide 調控，以下簡述兩者機制：

(1) ESCRT 調控 (Henne, Buchkovich et al. 2011)

高基氏體修飾後的蛋白質或細胞膜上的蛋白質 (例如: activated growth factor receptors) 經內吞後其 cytosolic domains 會被接上泛素 (ubiquitin)，泛素化的蛋白質在內體或多泡體被 ESCRT0 complexes 辨認，聚集在 microdomains 後與 ESCRTI complexes 結合，並召集 ESCRTII subunits，啟動內體或多泡體膜內陷，此時除了位在 microdomains 上的蛋白質，細胞質內的 RNAs 與其他蛋白質亦會一起進入內陷的膜內腔，ESCRTIII subunits 被召集至此並負責切斷內陷的膜形成管腔內囊泡，最後藉由 class I AAA (ATPase associated with various cellular activities) ATPase Vps4 水解 ATP 提供能量使 ESCRTIII complexes 拆解回到細胞內再循環。

(2) ceramide 調控

部分蛋白質 (例如: proteolipid protein, PLP) 位於 raft-based microdomains，此區域的特性為富含許多神經脂質，當 Neutral sphingomyelinases 產生的 ceramide 含量增加時被認為可引起 microdomains 膜內陷，產生管腔內囊泡，但此機制目前仍待詳細研究。

我們預期過表達 Ifc 會刺激外吐小體釋放，但不確定 Ifc 影響的是外吐小體

的生成或是促進多泡體與細胞膜的融合等，為了釐清 *Ifc* 過表達是否影響多泡體內管腔內囊泡的生成，已知 Rab5-Q79L (Rab5-CA) 突變會導致巨大內體生成以利觀察多泡體內的管腔內囊泡數目 (Stenmark, Parton et al. 1994, Wegner, Malerod et al. 2010)，我們會在果蠅視神經同時過表達 Rab5-CA、*Ifc*-mCherry 與 CD63-GFP，觀察 Rab5 所標定的內體內 CD63-GFP 的訊號其型態與螢光強度是否有差異，若有，未來亦可將此果蠅以穿透式電子顯微鏡進行超微分析。

若過表達 *Ifc* 會造成多泡體之管腔內囊泡生成增加，顯示 *Ifc* 參與調控外吐小體的生成，則我們想探討 *Ifc* 的調控是否為 ESCRT dependent 機制，故在 *DE*-Gal4 過表達 *Ifc*-mCherry 的系統上，分別以 RNAi 技術降低 ESCRT pathway 上的各個作用蛋白，如：HRS (ESCRT0)、TSG101 (ESCRTI)、VPS36 (ESCRTII)、Snf7 (ESCRTIII) 與 VPS4，若降低上述蛋白質的表現量會造成 *Ifc*-mCherry 無法被運送至非 *DE*-Gal4 表現區域，則代表 *Ifc* 受 ESCRT dependent 機制影響，反之則可排除 ESCRT 對 *Ifc* 所調控的外吐小體釋放機制之影響。

ifc 是否影響自噬作用與外吐小體分泌

多泡體生成後會走向分泌或降解路徑，當多泡體與細胞膜融合後藉分泌路徑將外吐小體釋放到細胞外，或者將管腔內囊泡釋放至細胞質中與溶酶體融合進行降解作用。

實驗室先前研究發現 *ifc*-KO 同型合子幼蟲中細胞自噬作用相關基因 (autophagy related genes) 表現量顯著增加，而我們亦觀察到失去 *ifc* 後視神經細胞內脂噬作用提升，因此我們推論失去 *ifc* 會促使細胞自噬作用增加，而我們想探討此自噬作用提升是否會抑制細胞內外吐小體釋放，故我們會在 *ifc*-KO 全感光突變群組過表達 CD63-GFP 或 Rab4-YFP，預期實驗組中 CD63-GFP 或 Rab4-YFP 的螢光訊號與強度應該較控制組少，我們希望建立 *DEGS1*-KO 細胞株，透過收集 medium 來分析外吐小體是否因失去 *DEGS1* 而減少。

5.4 *ifc* 是否影響 lipid raft 上之 Flo2 蛋白造成細胞膜內運輸與內吞作用失常

Flotillin 1/2 (Flo2/1)位於富含固醇與神經脂質的 lipid raft 上，目前已知 Flo2 會調控內吞作用(Meister and Tikkanen 2014)，而實驗室先前研究已證明失去 *ifc* 影響了各神經脂質在細胞內的比例(Jung, Liu et al. 2017)，我觀察到 *ifc*-KO 細胞中有 Rh1、Chp 與中性油滴堆積，且視神經細胞中 *Ifc* 與 Flo2 共位，因此未來想要探討探討失去 *ifc* 是否影響 lipid raft 上 Flo2 所調控的內吞作用而造成細胞內特殊 cargo 堆積，我們向廣島大學的 Dr. Satoh 實驗室尋求自製的 Rh1 抗體，取得抗體後我們會將 Rh1 與 Na⁺/K⁺ ATPase 共染，觀察失去 *ifc* 後堆積的 Rh1 位於視細胞內或外。再來，我們會分離 *ifc*-KO 同型合子幼蟲中之 lipid raft 並分析 Flo2 蛋白質的表現量，預期實驗組的表現量會較控制組增加，再來，我們希望在 *ifc*-KO 全感光突變群組中以 *flo2* 無性突變減少 Flo2 表現量，觀察 Rh1、Chp 與中性油滴堆積是否因此減少，以及是否能恢復視神經型態與功能退化，若能成功恢復堆積與退化現象，則顯示失去 *ifc* 影響了 Flo2 所參與的內膜運輸作用。



第六章

實驗圖表

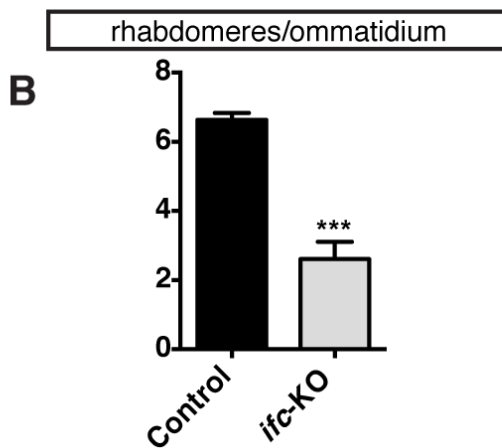
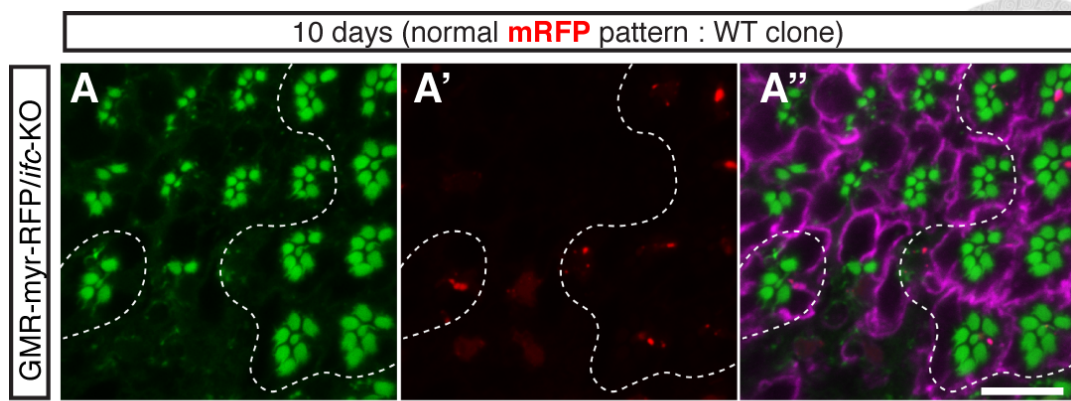


Fig. 1 在果蠅視神經失去 *ifc* 造成漸進式活性細胞退化

以 *eyFLP* 產生之 *ifc*-KO 感光細胞突變群組分析。(A)(A')(A'') 果蠅視神經細胞以 mRFP 標定控制組細胞，*ifc*-KO 同型合子細胞則無螢光訊號，鬼筆環肽 (phalloidin) 標定桿狀小體(綠色)， Na^+/K^+ ATPase 標定神經細胞膜(紫紅色)。將眼睛為 *ifc*-KO 感光細胞突變群組之果蠅照光 10 天，發現 *ifc*-KO 同型合子細胞相較於控制組細胞，其視神經細胞型態有明顯退化的情形。(B) 果蠅視神經細胞桿狀小體量化圖。

比例尺：10 μm

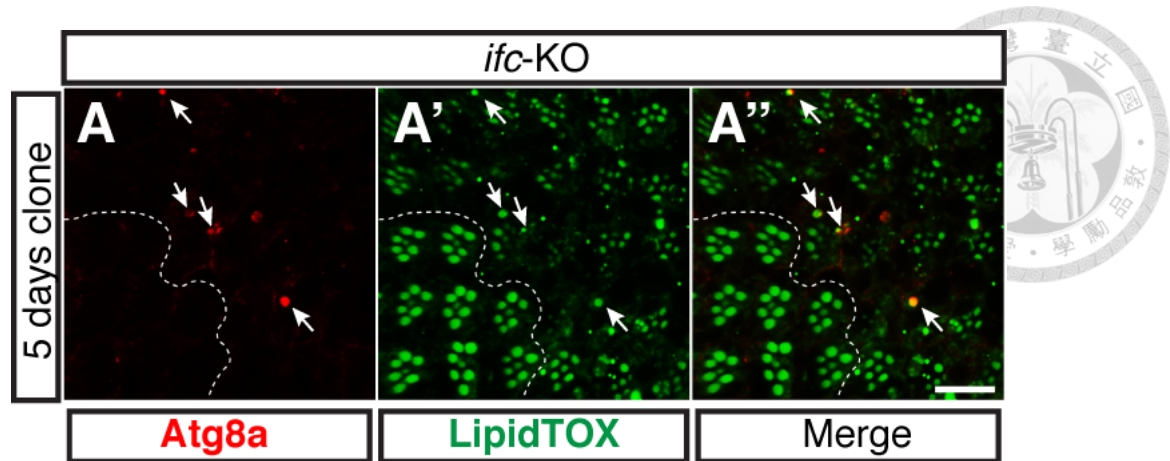


Fig. 2 在果蠅視神經失去 *ifc* 造成脂噬作用增加

以 *eyFLP* 產生之 *ifc*-KO 感光細胞突變群組照光 5 天。(A) Atg8a 抗體染色標記細胞自噬小體(紅色)。(A') LipidTOX 標定桿狀小體與中性油滴(綠色)。(A'')箭號表示視神經細胞內脂噬作用(Atg8a 與 LipidTOX 訊號共位)。

比例尺: 10 μ m。

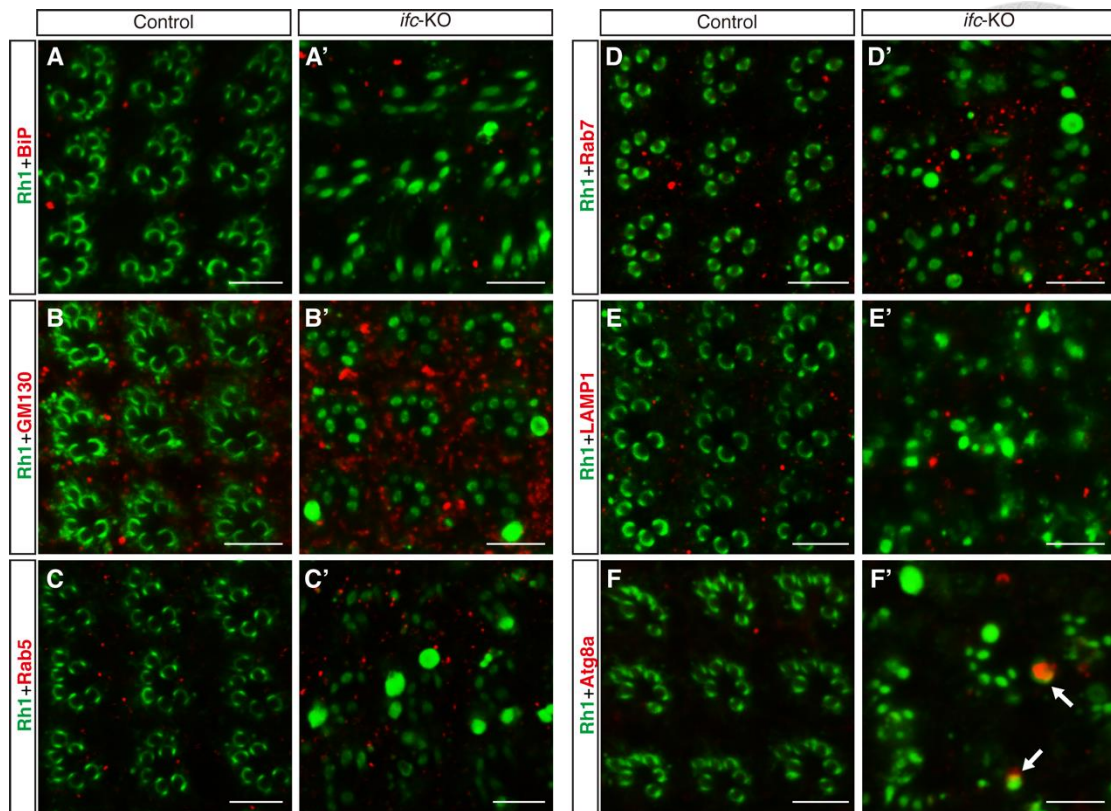


Fig. 3 在果蠅視神經失去 *ifc* 會造成 Rh1 堆積在 Atg8a 相關胞器

以 *eyFLP* 在果蠅眼睛細胞產生同型合子 *ifc-KO* 的細胞，照光 3 天後分別以抗體 BiP(內質網，紅色)、GM130(高基氏體，紅色)、Rab5(初級內體，紅色) 及 Rab7(次級內體/溶酶體，紅色)、Atg8a(自噬小體，紅色)與 Rh1 抗體共染(綠色)。(A)(B)(C)(D)(E)(F) 控制組。(A')(B')(C')(D')(E')(F') *ifc-KO* 同型合子細胞。箭號表示 Rh1 與 Atg8a 共位。

比例尺：5 μ m

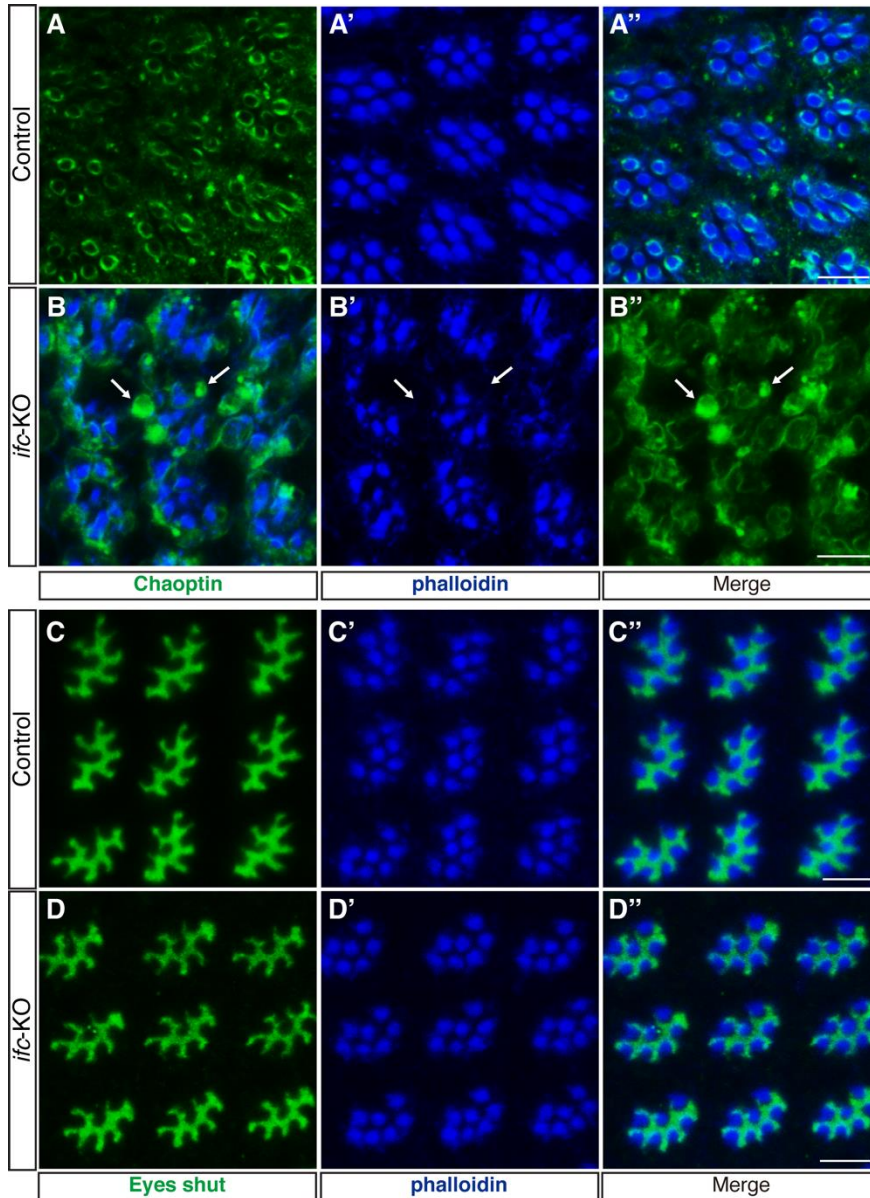


Fig. 4 在果蠅視神經失去 *ifc* 會造 Chaoptin 堆積，但不影響 Eyes shut

eyFLP 產生之 *ifc-KO* 感光細胞突變群組照光 3 天，以免疫螢光染色觀察桿狀小體 (phalloidin, 藍色)、Chaoptin (綠色) 與 Eyes shut (綠色)。(A)(A')(A'')以 *ifc-KO* 異型合子果蠅作為控制組，觀察桿狀小體與 Chaoptin 蛋白。(B)(B')(B'')*ifc-KO* 感光細胞突變群組，觀察桿狀小體與 Chaoptin 蛋白。(C)(C')(C'')以 *ifc-KO* 異型合子果蠅作為控制組，觀察桿狀小體與 Eyes shut 蛋白。(D)(D')(D'')*ifc-KO* 感光細胞突變群組，觀察桿狀小體與 Eyes shut 蛋白。箭號表示 Chaoptin 堆積。

比例尺：5 μ m

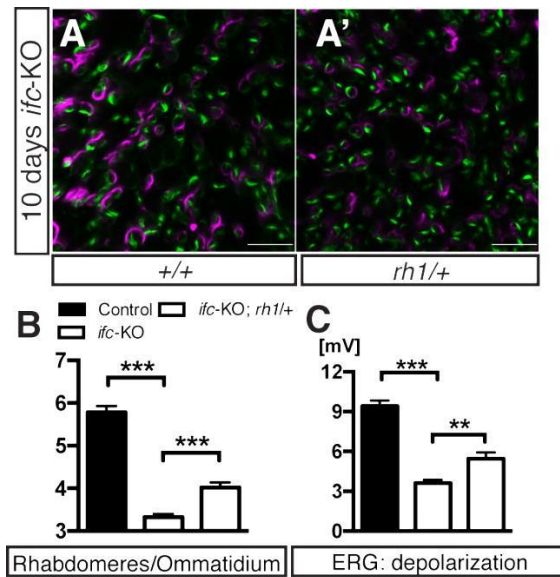


Fig. 5 減少 Rh1 表現會恢復失去 *ifc* 後產生的漸進式神經退化

在 *eyFLP* 產生之 *ifc-KO* 感光細胞突變群組中以 *rh1* 無性突變減少 Rh1 表現量，照光 10 天後以鬼筆環肽 (phalloidin) 標定桿狀小體(綠色)， Na^+/K^+ ATPase 標定神經細胞膜(紫紅色)。(A)控制組：*ifc-KO* 感光細胞突變群組。(A')實驗組：*ifc-KO* 感光細胞突變群組 + *rh1* 無性突變異型合子之視神經細胞。(B)果蠅視神經細胞桿狀小體量化圖。(C) ERG 視神經細胞電位量化圖。

比例尺：10 μm

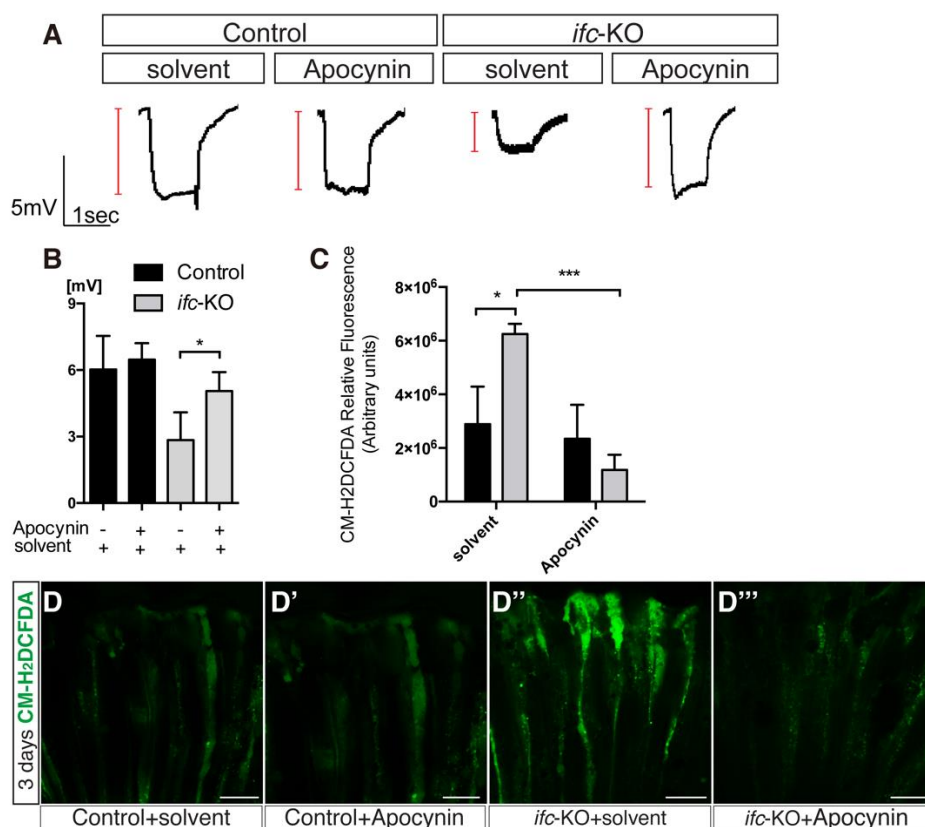


Fig. 6 餵食 Apocynin 抑制 NOX 會恢復 *ifc*-KO 產生的漸進式神經退化與降低 ROS

以 *eyFLP* 產生之 *ifc*-KO 感光細胞突變群組，餵食 Apocynin 並照光 3 天，以 CM-H₂DCFDA (綠色)偵測 ROS。(A) *ifc*-KO 感光細胞突變群組之視神經電位紀錄 (electroretinogram)。(B) ERG 視神經細胞電位量化圖。(C) CM-H₂DCFDAERG 螢光訊號量化圖。(D) (D') (D'') (D''') CM-H₂DCFDAERG 螢光訊號。

比例尺：10 μ m

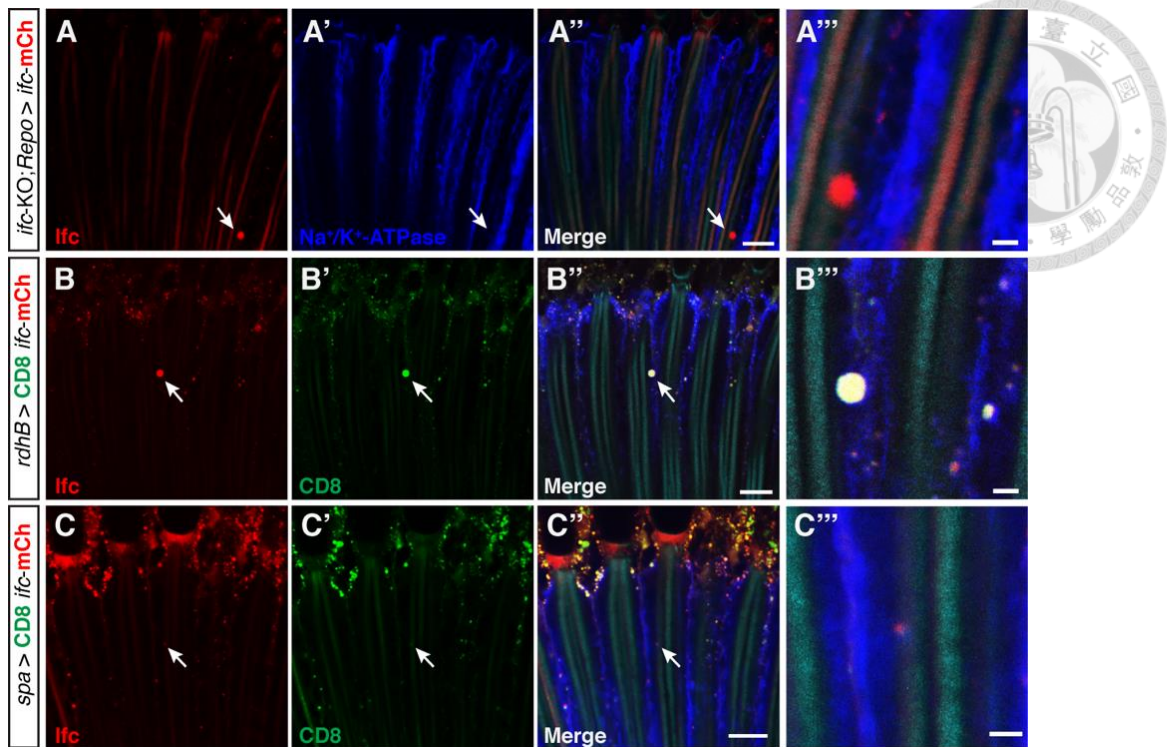


Fig. 7 果蠅神經膠細胞表現 Ifc-mCherry 會出現在視神經細胞

在不同組織過表達 Ifc-mCherry 後偵測其訊號位置。以 mCD8::GFP 標定表現細胞，鬼筆環肽 (phalloidin) 標定桿狀小體(青色)， Na^+/K^+ ATPase 標定神經細胞膜(藍色)。(A)(A')(A'')(A''') *ifc*-KO 同型合子以神經膠細胞過表達 Ifc-mCherry 拯救 lethality 之果蠅視神經。(B)(B')(B'')(B''') 以 *rdhB*-Gal4 在色素細胞過表達 Ifc-mCherry 之果蠅視神經。(C)(C')(C'')(C''') 以 *spa*-Gal4 在錐細胞過表達 Ifc-mCherry 之果蠅視神經。

(A'')(B'')(C'')(D'') 比例尺：10 μm

(A''')(B''')(C''')(D''') 比例尺：2 μm

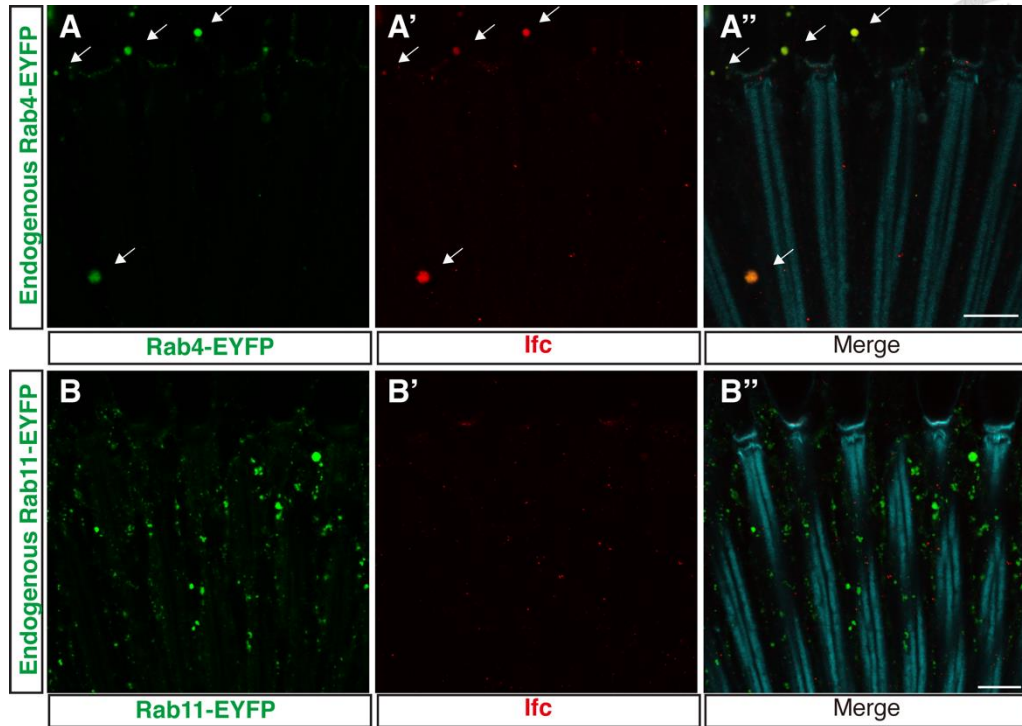


Fig. 8 Ifc 與內生性 Rab4 共位

在不同再循環小體相關之內生性 Rab-EYFP 上以免役組織螢光染色觀察 Ifc 其訊號位置。鬼筆環肽 (phalloidin) 標定桿狀小體(青色)，Ifc(紅色)。(A)(A')(A'')內生性 Rab4-EYFP 與 Ifc 之表現位置。(B)(B')(B'')內生性 Rab11-EYFP 與 Ifc 之表現位置。箭號指示 Rab4-EYFP 與 Ifc 共位。

比例尺：10 μ m

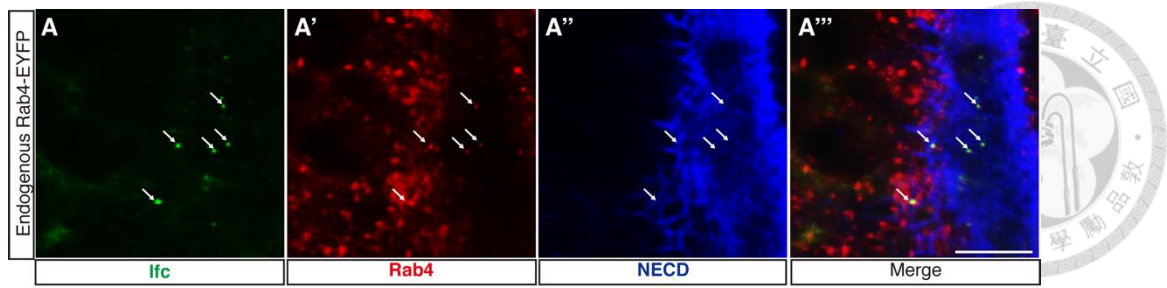


Fig. 9 果蠅三齡幼蟲眼碟細胞外之 Ifc 位於 Rab4-EYFP 相關之囊泡

在內生性 Rab4-EYFP 果蠅發育中的眼碟細胞中，以 PBS 條件染色(不破膜)，NECD 標定細胞外區域，觀察細胞外之 Ifc 與 Rab4-EYFP 之共位現象。(A)細胞外之 Ifc 訊號。(B)內生性之 Rab4-EYFP 訊號(經套色處理成紅色)。(C)NECD 訊號。(D)前述三者訊號疊圖。箭號表示細胞外位於 Rab4-EYFP 相關囊泡之 Ifc。

比例尺：3 μm

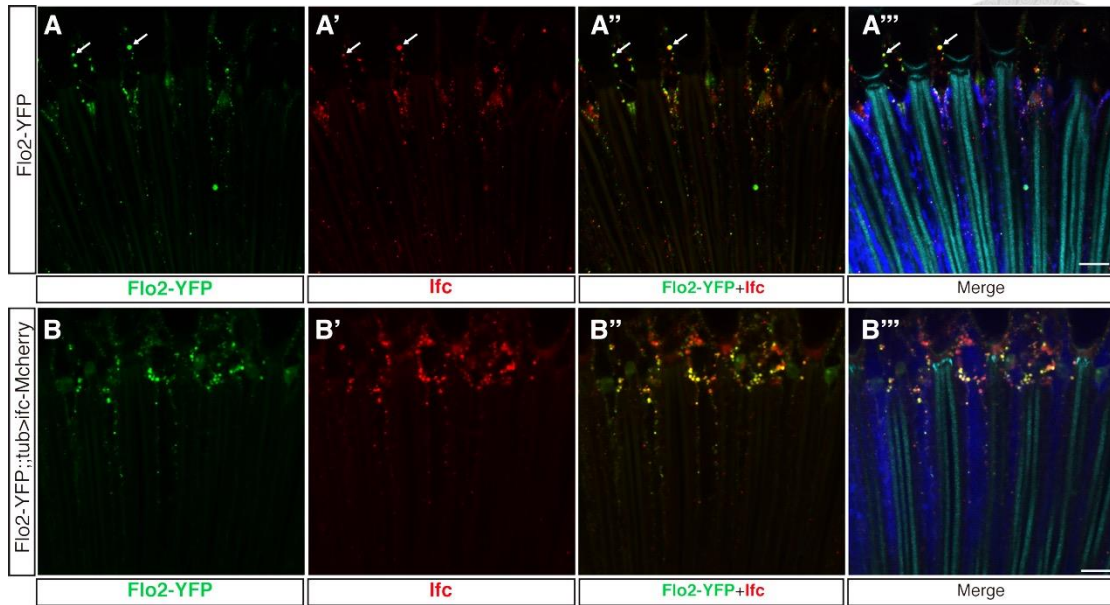


Fig. 10 *Ifc* 位於 *Flo2*-YFP 相關之囊泡

(A)(A')(A'')(A''')在內生性 *Flo2*-YFP 果蠅之視神經細胞中，以免疫螢光染色觀察 *Ifc* 與 *Flo2* 訊號共位現象。(B)(B')(B'')(B''')在內生性 *Flo2*-YFP 果蠅之視神經細胞中，以 *tub*-Gal4 全身性過表達 *Ifc*-mCherry，觀察 *Ifc*-mCherry 與 *Flo2* 訊號共位現象。箭號表示 *Flo2* 與 *Ifc* 訊號共位。

比例尺：10 μ m

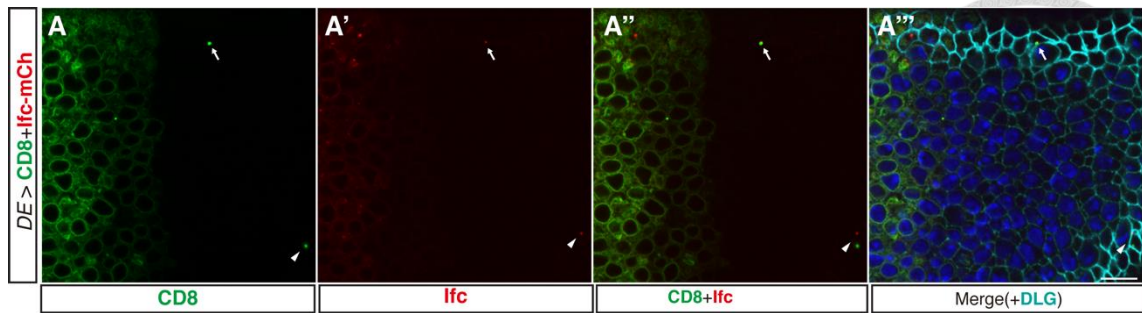


Fig. 11 果蠅三齡幼蟲眼碟細胞外之 *Ifc-mCherry* 與 *mCD8::GFP* 可離開表現細胞在果蠅幼蟲眼碟背側表現 *Ifc-mCherry* 與 *mCD8::GFP*，以 PBS 條件染色(不破膜)，DLG 標定細胞邊界，觀察 *Ifc-mCherry* 與 *mCD8::GFP* 離開製造細胞之現象。(A) 細胞外之 *Ifc* 訊號。(B) 內生性之 *Rab4-EYFP* 訊號(經套色處理成紅色)。(C) *NECD* 訊號。(D) 前述三者訊號疊圖。箭頭表示細胞外位於 *Rab4-EYFP* 相關囊泡之 *Ifc*。箭號表示離開製造細胞之 *Ifc-mCherry* 與 *mCD8::GFP*(共位)，箭頭表示離開製造細胞之 *Ifc-mCherry* 與 *mCD8::GFP*(非共位)。

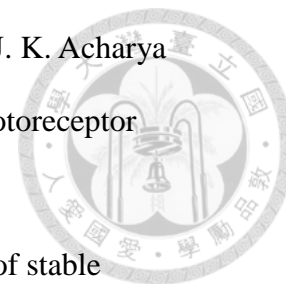
比例尺：3 μm



第七章

參考文獻

Acharya, U., S. Patel, E. Koundakjian, K. Nagashima, X. Han and J. K. Acharya (2003). "Modulating sphingolipid biosynthetic pathway rescues photoreceptor degeneration." Science **299**(5613): 1740-1743.



Alloway, P. G., L. Howard and P. J. Dolph (2000). "The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration." Neuron **28**(1): 129-138.

Alvarez, C. E. (2008). "On the origins of arrestin and rhodopsin." BMC Evol Biol **8**: 222.

Balasubramanian, N. and V. Z. Slepak (2003). "Light-mediated activation of Rac-1 in photoreceptor outer segments." Curr Biol **13**(15): 1306-1310.

Beauchamp, E., X. Tekpli, G. Marteil, D. Lagadic-Gossmann, P. Legrand and V. Rioux (2009). "N-Myristoylation targets dihydroceramide Delta4-desaturase 1 to mitochondria: partial involvement in the apoptotic effect of myristic acid." Biochimie **91**(11-12): 1411-1419.

Belmonte, M. A., M. F. Santos, A. H. Kihara, C. Y. Yan and D. E. Hamassaki (2006). "Light-Induced photoreceptor degeneration in the mouse involves activation of the small GTPase Rac1." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(3): 1193-1200.

Bickel, P. E., P. E. Scherer, J. E. Schnitzer, P. Oh, M. P. Lisanti and H. F. Lodish (1997). "Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins." J Biol Chem **272**(21): 13793-13802.

Blanc, L. and M. Vidal (2017). "New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion." Small GTPases: 1-12.

Bloomquist, B. T., R. D. Shortridge, S. Schneuwly, M. Perdew, C. Montell, H. Steller, G. Rubin and W. L. Pak (1988). "Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, norpA, and its role in phototransduction." Cell **54**(5): 723-733.

Bulgakova, N. A. and E. Knust (2009). "The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration." J Cell Sci **122**(Pt 15): 2587-2596.

Cagan, R. (2009). "Principles of Drosophila eye differentiation." Curr Top Dev Biol **89**: 115-135.

Cao, J., Y. Li, W. Xia, K. Reddig, W. Hu, W. Xie, H. S. Li and J. Han (2011). "A Drosophila metallophosphoesterase mediates deglycosylation of rhodopsin." EMBO J **30**(18): 3701-3713.

Carayon, K., K. Chaoui, E. Ronzier, I. Lazar, J. Bertrand-Michel, V. Roques, S. Balor, F. Terce, A. Lopez, L. Salome and E. Joly (2011). "Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation." J Biol Chem **286**(39): 34426-34439.

Causeret, C., L. Geeraert, G. Van der Hoeven, G. P. Mannaerts and P. P. Van Veldhoven (2000). "Further characterization of rat dihydroceramide desaturase: tissue distribution, subcellular localization, and substrate specificity." Lipids **35**(10): 1117-1125.

Chan, J. P., Z. Hu and D. Sieburth (2012). "Recruitment of sphingosine kinase to presynaptic terminals by a conserved muscarinic signaling pathway promotes neurotransmitter release." Genes Dev **26**(10): 1070-1085.

Chan, J. P. and D. Sieburth (2012). "Localized sphingolipid signaling at presynaptic terminals is regulated by calcium influx and promotes recruitment of priming factors." J Neurosci **32**(49): 17909-17920.

Chang, H. Y. and D. F. Ready (2000). "Rescue of photoreceptor degeneration in rhodopsin-null Drosophila mutants by activated Rac1." Science **290**(5498): 1978-1980.

Chartier, F. J., E. J. Hardy and P. Laprise (2012). "Crumbs limits oxidase-dependent signaling to maintain epithelial integrity and prevent photoreceptor cell death." J Cell

Biol **198**(6): 991-998.

Chinchore, Y., A. Mitra and P. J. Dolph (2009). "Accumulation of rhodopsin in late endosomes triggers photoreceptor cell degeneration." PLoS Genet **5**(2): e1000377.

Chyb, S., P. Raghu and R. C. Hardie (1999). "Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL." Nature **397**(6716): 255-259.

Clarke, C. J., C. F. Snook, M. Tani, N. Matmati, N. Marchesini and Y. A. Hannun (2006). "The extended family of neutral sphingomyelinases." Biochemistry **45**(38): 11247-11256.

Colombo, M., G. Raposo and C. Thery (2014). "Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles." Annu Rev Cell Dev Biol **30**: 255-289.

D'Angelo, G., T. Matussek, S. Pizette and P. P. Therond (2015). "Endocytosis of Hedgehog through dispatched regulates long-range signaling." Dev Cell **32**(3): 290-303.

Darios, F., C. Wasser, A. Shakirzyanova, A. Giniatullin, K. Goodman, J. L.

Munoz-Bravo, J. Raingo, J. Jorgacevski, M. Kreft, R. Zorec, J. M. Rosa, L. Gandia, L. M. Gutierrez, T. Binz, R. Giniatullin, E. T. Kavalali and B. Davletov (2009).

"Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis." Neuron **62**(5): 683-694.

de Gassart, A., C. Geminard, B. Fevrier, G. Raposo and M. Vidal (2003). "Lipid raft-associated protein sorting in exosomes." Blood **102**(13): 4336-4344.

den Hollander, A. I., J. B. ten Brink, Y. J. de Kok, S. van Soest, L. I. van den Born, M.

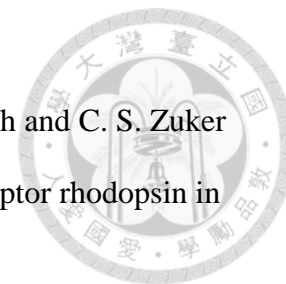
A. van Driel, D. J. van de Pol, A. M. Payne, S. S. Bhattacharya, U. Kellner, C. B.

Hoyng, A. Westerveld, H. G. Brunner, E. M. Bleeker-Wagemakers, A. F. Deutman, J.

R. Heckenlively, F. P. Cremers and A. A. Bergen (1999). "Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12)." Nat Genet

23(2): 217-221.

Dolph, P. J., R. Ranganathan, N. J. Colley, R. W. Hardy, M. Socolich and C. S. Zuker (1993). "Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo." Science **260**(5116): 1910-1916.



Dourlen, P., B. Bertin, G. Chatelain, M. Robin, F. Napoletano, M. J. Roux and B. Mollereau (2012). "Drosophila fatty acid transport protein regulates rhodopsin-1 metabolism and is required for photoreceptor neuron survival." PLoS Genet **8**(7): e1002833.

Endo, K., T. Akiyama, S. Kobayashi and M. Okada (1996). "Degenerative spermatocyte, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in Drosophila spermatogenesis." Mol Gen Genet **253**(1-2): 157-165.

Fivaz, M., F. Vilbois, S. Thurnheer, C. Pasquali, L. Abrami, P. E. Bickel, R. G. Parton and F. G. van der Goot (2002). "Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins." EMBO J **21**(15): 3989-4000.

Goni, F. M., J. Sot and A. Alonso (2014). "Biophysical properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids." Biochem Soc Trans **42**(5): 1401-1408.

Gosens, I., A. I. den Hollander, F. P. Cremers and R. Roepman (2008). "Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina." Exp Eye Res **86**(5): 713-726.

Gross, J. C., V. Chaudhary, K. Bartscherer and M. Boutros (2012). "Active Wnt proteins are secreted on exosomes." Nat Cell Biol **14**(10): 1036-1045.

Gurudev, N., M. Yuan and E. Knust (2014). "chaoptin, prominin, eyes shut and crumbs form a genetic network controlling the apical compartment of Drosophila photoreceptor cells." Biol Open **3**(5): 332-341.

Hannun, Y. A. and L. M. Obeid (2008). "Principles of bioactive lipid signalling:

lessons from sphingolipids." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 139-150.

Heijnen, H. F., A. E. Schiel, R. Fijnheer, H. J. Geuze and J. J. Sixma (1999).

"Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules." Blood **94**(11): 3791-3799.

Henne, W. M., N. J. Buchkovich and S. D. Emr (2011). "The ESCRT pathway." Dev Cell **21**(1): 77-91.

Hla, T. and A. J. Dannenberg (2012). "Sphingolipid signaling in metabolic disorders." Cell Metab **16**(4): 420-434.

Hsu, C., Y. Morohashi, S. Yoshimura, N. Manrique-Hoyos, S. Jung, M. A. Lauterbach, M. Bakhti, M. Gronborg, W. Mobius, J. Rhee, F. A. Barr and M. Simons (2010).

"Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C." J Cell Biol **189**(2): 223-232.

Hurley, J. H. and S. D. Emr (2006). "The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network." Annu Rev Biophys Biomol Struct **35**: 277-298.

Husain, N., M. Pellikka, H. Hong, T. Klimentova, K. M. Choe, T. R. Clandinin and U. Tepass (2006). "The agrin/perlecan-related protein eyes shut is essential for epithelial lumen formation in the Drosophila retina." Dev Cell **11**(4): 483-493.

Iwanami, N., Y. Nakamura, T. Satoh, Z. Liu and A. K. Satoh (2016). "Rab6 Is Required for Multiple Apical Transport Pathways but Not the Basolateral Transport Pathway in Drosophila Photoreceptors." PLoS Genet **12**(2): e1005828.

Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-269.

Jung, W. H., C. C. Liu, Y. L. Yu, Y. C. Chang, W. Y. Lien, H. C. Chao, S. Y. Huang, C. H. Kuo, H. C. Ho and C. C. Chan (2017). "Lipophagy prevents activity-dependent

neurodegeneration due to dihydroceramide accumulation in vivo." EMBO Rep.

Kalra, H., R. J. Simpson, H. Ji, E. Aikawa, P. Altevogt, P. Askenase, V. C. Bond, F. E. Borrás, X. Breakefield, V. Budnik, E. Buzas, G. Camussi, A. Clayton, E. Cocucci, J. M. Falcon-Perez, S. Gabrielsson, Y. S. Ghosh, D. Gupta, H. C. Harsha, A. Hendrix, A. F. Hill, J. M. Inal, G. Jenster, E. M. Kramer-Albers, S. K. Lim, A. Llorente, J. Lotvall, A. Marcilla, L. Mincheva-Nilsson, I. Nazarenko, R. Nieuwland, E. N. Nolte-'t Hoen, A. Pandey, T. Patel, M. G. Piper, S. Pluchino, T. S. Prasad, L. Rajendran, G. Raposo, M. Record, G. E. Reid, F. Sanchez-Madrid, R. M. Schiffelers, P. Siljander, A. Stensballe, W. Stoorvogel, D. Taylor, C. Thery, H. Valadi, B. W. van Balkom, J. Vazquez, M. Vidal, M. H. Wauben, M. Yanez-Mo, M. Zoeller and S. Mathivanan (2012).

"Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation." PLoS Biol **10**(12): e1001450.

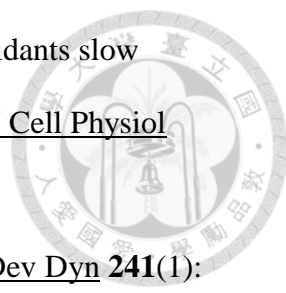
Kang, K. H., G. Lemke and J. W. Kim (2009). "The PI3K-PTEN tug-of-war, oxidative stress and retinal degeneration." Trends Mol Med **15**(5): 191-198.

Kaylor, J. J., Q. Yuan, J. Cook, S. Sarfare, J. Makshanoff, A. Miu, A. Kim, P. Kim, S. Habib, C. N. Roybal, T. Xu, S. Nusinowitz and G. H. Travis (2013). "Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Muller glial cells of the retina." Nat Chem Biol **9**(1): 30-36.

Kiselev, A., M. Socolich, J. Vinos, R. W. Hardy, C. S. Zuker and R. Ranganathan (2000). "A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*." Neuron **28**(1): 139-152.

Kiselev, A. and S. Subramaniam (1994). "Activation and regeneration of rhodopsin in the insect visual cycle." Science **266**(5189): 1369-1373.

Kolter, T. and K. Sandhoff (2005). "Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 81-103.

- 
- Komeima, K., B. S. Rogers and P. A. Campochiaro (2007). "Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa." J Cell Physiol **213**(3): 809-815.
- Kumar, J. P. (2012). "Building an ommatidium one cell at a time." Dev Dyn **241**(1): 136-149.
- Kurada, P. and J. E. O'Tousa (1995). "Retinal degeneration caused by dominant rhodopsin mutations in *Drosophila*." Neuron **14**(3): 571-579.
- Lambeth, J. D. (2007). "Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy." Free Radic Biol Med **43**(3): 332-347.
- Lee, J., M. Song and S. Hong (2013). "Negative regulation of the novel norpA(P24) suppressor, diehard4, in the endo-lysosomal trafficking underlies photoreceptor cell degeneration." PLoS Genet **9**(6): e1003559.
- Leung, H. T., C. Geng and W. L. Pak (2000). "Phenotypes of *trpl* mutants and interactions between the transient receptor potential (TRP) and TRP-like channels in *Drosophila*." J Neurosci **20**(18): 6797-6803.
- Lingwood, D. and K. Simons (2010). "Lipid rafts as a membrane-organizing principle." Science **327**(5961): 46-50.
- Lock, J. G. and J. L. Stow (2005). "Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin." Mol Biol Cell **16**(4): 1744-1755.
- Meister, M. and R. Tikkanen (2014). "Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view." Membranes (Basel) **4**(3): 356-371.
- Michel, C. and G. van Echten-Deckert (1997). "Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum." FEBS Lett **416**(2): 153-155.
- Michel, C., G. van Echten-Deckert, J. Rother, K. Sandhoff, E. Wang and A. H. Merrill, Jr. (1997). "Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase

introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide." J Biol Chem **272**(36): 22432-22437.

Mizutani, Y., A. Kihara and Y. Igarashi (2004). "Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation." FEBS Lett **563**(1-3): 93-97.

Morrison, C. M. and G. Halder (2010). "Characterization of a dorsal-eye Gal4 Line in *Drosophila*." Genesis **48**(1): 3-7.

Nie, J., S. Mahato, W. Mustill, C. Tipping, S. S. Bhattacharya and A. C. Zelhof (2012). "Cross species analysis of Prominin reveals a conserved cellular role in invertebrate and vertebrate photoreceptor cells." Dev Biol **371**(2): 312-320.

Nie, J., S. Mahato and A. C. Zelhof (2014). "The actomyosin machinery is required for *Drosophila* retinal lumen formation." PLoS Genet **10**(9): e1004608.

Niemeyer, B. A., E. Suzuki, K. Scott, K. Jalink and C. S. Zuker (1996). "The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL." Cell **85**(5): 651-659.

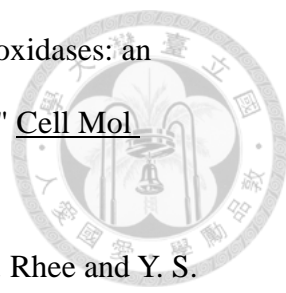
Omae, F., M. Miyazaki, A. Enomoto, M. Suzuki, Y. Suzuki and A. Suzuki (2004). "DES2 protein is responsible for phytoceramide biosynthesis in the mouse small intestine." Biochem J **379**(Pt 3): 687-695.

Orem, N. R., L. Xia and P. J. Dolph (2006). "An essential role for endocytosis of rhodopsin through interaction of visual arrestin with the AP-2 adaptor." J Cell Sci **119**(Pt 15): 3141-3148.

Ostrowski, M., N. B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C. F. Moita, K. Schauer, A. N. Hume, R. P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M.

Fukuda, C. Desnos, M. C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L. F. Moita and C.

They (2010). "Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway." Nat Cell Biol **12**(1): 19-30; sup pp 11-13.

- 
- Panday, A., M. K. Sahoo, D. Osorio and S. Batra (2015). "NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies." Cell Mol Immunol **12**(1): 5-23.
- Park, H. S., S. H. Lee, D. Park, J. S. Lee, S. H. Ryu, W. J. Lee, S. G. Rhee and Y. S. Bae (2004). "Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H₂O₂." Mol Cell Biol **24**(10): 4384-4394.
- Perez-Hernandez, D., C. Gutierrez-Vazquez, I. Jorge, S. Lopez-Martin, A. Ursa, F. Sanchez-Madrid, J. Vazquez and M. Yanez-Mo (2013). "The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes." J Biol Chem **288**(17): 11649-11661.
- Ramirez-Weber, F. A. and T. B. Kornberg (1999). "Cytosomes: cellular processes that project to the principal signaling center in Drosophila imaginal discs." Cell **97**(5): 599-607.
- Reinke, R., D. E. Krantz, D. Yen and S. L. Zipursky (1988). "Choptin, a cell surface glycoprotein required for Drosophila photoreceptor cell morphogenesis, contains a repeat motif found in yeast and human." Cell **52**(2): 291-301.
- Riboni, L., P. Viani, R. Bassi, A. Prinetti and G. Tettamanti (1997). "The role of sphingolipids in the process of signal transduction." Prog Lipid Res **36**(2-3): 153-195.
- Rosenbaum, E. E., K. S. Brehm, E. Vasiljevic, C. H. Liu, R. C. Hardie and N. J. Colley (2011). "XPORT-dependent transport of TRP and rhodopsin." Neuron **72**(4): 602-615.
- Rosenbaum, E. E., R. C. Hardie and N. J. Colley (2006). "Calnexin is essential for rhodopsin maturation, Ca²⁺ regulation, and photoreceptor cell survival." Neuron **49**(2): 229-241.
- Running Deer, J. L., J. B. Hurley and S. L. Yarritz (1995). "G protein control of

Drosophila photoreceptor phospholipase C." J Biol Chem **270**(21): 12623-12628.

Sankaram, M. B. and T. E. Thompson (1990). "Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state ²H nuclear magnetic resonance study."

Biochemistry **29**(47): 10676-10684.

Schroeder, R., E. London and D. Brown (1994). "Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12130-12134.

Shen, H., F. Giordano, Y. Wu, J. Chan, C. Zhu, I. Milosevic, X. Wu, K. Yao, B. Chen, T. Baumgart, D. Sieburth and P. De Camilli (2014). "Coupling between endocytosis and sphingosine kinase 1 recruitment." Nat Cell Biol **16**(7): 652-662.

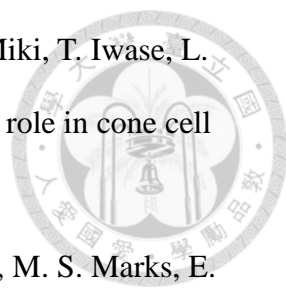
Siddique, M. M., B. T. Bikman, L. Wang, L. Ying, E. Reinhardt, G. Shui, M. R. Wenk and S. A. Summers (2012). "Ablation of dihydroceramide desaturase confers resistance to etoposide-induced apoptosis in vitro." PLoS One **7**(9): e44042.

Stenmark, H., R. G. Parton, O. Steele-Mortimer, A. Lutcke, J. Gruenberg and M. Zerial (1994). "Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis." EMBO J **13**(6): 1287-1296.

Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, D. J. Sulciner, J. S. Gutkind, K. Irani, P. J. Goldschmidt-Clermont and T. Finkel (1996). "Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1." Biochem J **318** (Pt 2): 379-382.

Trajkovic, K., A. S. Dhaunchak, J. T. Goncalves, D. Wenzel, A. Schneider, G. Bunt, K. A. Nave and M. Simons (2006). "Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites." J Cell Biol **172**(6): 937-948.

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



Usui, S., B. C. Oveson, S. Y. Lee, Y. J. Jo, T. Yoshida, A. Miki, K. Miki, T. Iwase, L. Lu and P. A. Campochiaro (2009). "NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa." J Neurochem **110**(3): 1028-1037.

van Niel, G., S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, M. S. Marks, E. Rubinstein and G. Raposo (2011). "The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis." Dev Cell **21**(4): 708-721.

Vidal, M. J. and P. D. Stahl (1993). "The small GTP-binding proteins Rab4 and ARF are associated with released exosomes during reticulocyte maturation." Eur J Cell Biol **60**(2): 261-267.

Wang, T. and C. Montell (2007). "Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*." Pflugers Arch **454**(5): 821-847.

Wegner, C. S., L. Malerod, N. M. Pedersen, C. Progida, O. Bakke, H. Stenmark and A. Brech (2010). "Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5." Histochem Cell Biol **133**(1): 41-55.


Weidberg, H., E. Shvets and Z. Elazar (2009). "Lipophagy: selective catabolism designed for lipids." Dev Cell **16**(5): 628-630.

Williams, R. L. and S. Urbe (2007). "The emerging shape of the ESCRT machinery." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 355-368.

Xiong, B. and H. J. Bellen (2013). "Rhodopsin homeostasis and retinal degeneration: lessons from the fly." Trends Neurosci **36**(11): 652-660.

Xu, H., S. J. Lee, E. Suzuki, K. D. Dugan, A. Stoddard, H. S. Li, L. A. Chodosh and C. Montell (2004). "A lysosomal tetraspanin associated with retinal degeneration identified via a genome-wide screen." EMBO J **23**(4): 811-822.

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



Yanez-Mo, M., P. R. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borrás, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colas, A. Cordeiro-da Silva, S. Fais, J. M. Falcon-Perez, I. M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N. H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E. M. Kramer-Albers, S. Laitinen, C. Lasser, T. Lener, E. Ligeti, A. Line, G. Lipps, A. Llorente, J. Lotvall, M. Mancek-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E. N. Nolte-'t Hoen, T. A. Nyman, L. O'Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, E. Pallinger, H. A. Del Portillo, J. Reventos, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sanchez-Madrid, N. Santarem, K. Schallmoser, M. S. Ostefeld, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S. G. Van der Grein, M. H. Vasconcelos, M. H. Wauben and O. De Wever (2015). "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions." J Extracell Vesicles **4**: 27066.

Yau, K. W. and R. C. Hardie (2009). "Phototransduction motifs and variations." Cell **139**(2): 246-264.

Yonamine, I., T. Bamba, N. K. Nirala, N. Jesmin, T. Kosakowska-Cholody, K. Nagashima, E. Fukusaki, J. K. Acharya and U. Acharya (2011). "Sphingosine kinases and their metabolites modulate endolysosomal trafficking in photoreceptors." J Cell Biol **192**(4): 557-567.

Zelhof, A. C., R. W. Hardy, A. Becker and C. S. Zuker (2006). "Transforming the architecture of compound eyes." Nature **443**(7112): 696-699.

Zheng, W., J. Kollmeyer, H. Symolon, A. Momin, E. Munter, E. Wang, S. Kelly, J. C. Allegood, Y. Liu, Q. Peng, H. Ramaraju, M. C. Sullards, M. Cabot and A. H. Merrill, Jr. (2006). "Ceramide and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy." Biochim Biophys Acta **1758**(12): 1864-1884.