

肆、結果：

1. *Him* 基因於果蠅胚胎的表現情形 (Fig. 5)

Him gene 開始表現於 stage 9~10 表現在 trunk mesoderm primordium、dorsal ectoderm primordium、head mesoderm P2 primordium(Fig.5A)。Stage 11~12 dorsal vessel anlage(Fig.5B、Fig5C)。Stage 13~16 adult muscle precursor、embryonic/larva muscle system、embryo/larva dorsal vessel、ventral imaginal precursor、gonad (Fig.5D~H, F 為 E 的局部放大圖, H 為 G 的局部放大圖) 若單獨就在中胚層來看, *Him* 基因早期於整個中胚層, 隨著發育時期的推演, *Him* 基因漸漸侷限在 dorsal mesoderm, 之後 *Him* 基因的表現在背血管, 此情形與 dorsal mesoderm 最後的命運是很一致的, 最後侷限在果蠅背血管 Fig.5F 跟 Fig.5H 三角形所指區域(cardial cells and pericardial cells), 此外 *Him* 基因也表現在胚胎的肌肉系統, 果蠅的背血管的一部份即 cardiac cell 為部分的肌肉系統組成, 單就中胚層 *Him* 基因的表現情形, 是否暗示著 *Him* 基因於肌肉系統的分化或是果蠅背血管的分化及特化有功能存在。

嘗試著比較果蠅心臟發育的關鍵基因 *tinman* 的表現情形, stage 4~6 cellular blastoderm、foregut anlage in statu nascendi subset、trunk mesoderm anlage in statu nascendi。Stage 7~8 trunk mesoderm anlage、foregut(Fig.6A)。Stage 9~10 trunk mesoderm primordium、external

foregut primordium (Fig.6B) Stage 11~12 visceral muscle primordium、
cardiac mesoderm primordium (Fig.6C) Stage 13~16 dorsal vessel
(Fig.7C)。

若單獨比較 *Him* 與 *tinman* 在中胚層的表現情形，在 stage 7~8 時，
tinman 已出現於 trunk mesoderm anlage、foregut (Fig.6A)，而 *Him* 的
表現較晚一點於 stage 9~10 在 trunk mesoderm primordium 出現
(Fig.6E) stage 11~12 時，*tinman*、*Him* 均表現在 cardiac mesoderm
primordium (Fig.6C、F) Stage 13 以後此兩個基因就侷限表現於 dorsal
vessel，而 *tinman* 主要表現在每一體節心肌細胞 (cardial cells) 圍心
細胞 (pericardial cells) 各四顆，而 *Him* 為 mRNA 的染色，僅僅能看出
Him 在心肌細胞 (cardial cells) 圍心細胞 (pericardial cells) 均有表現，
但詳細表現的數目及細胞形式就需要製備 *Him* 的蛋白質抗體及比對
果蠅心臟細胞的細胞分子標誌如：表現於心肌細胞的 *Dmef2*、心肌細
胞及圍心細胞 *tinman*、圍心細胞的 *even skip* 等確定 *Him* 的表現位置。

2. *Tinman* 及 *pannier* 間接或直接調控 *Him* 基因

***Tinman* domain negative expression in mesoderm**

由於含 repressor domain 的 *Tinman* 蛋白質在中胚層大量表現，間
接造成抑制 *tinman* 在中胚層的功能，將此胚胎作 *Him* 基因的原位雜
和 (in situ hybridization) 其目的在於瞭解 *tinman* 和 *Him* 之間的關係，
從結果看來，當 *tinman* 在中胚層的功能受到抑制，相對的果蠅心臟

細胞會有減少或缺失的現象(Bodmer, 1993)，圖為 *Him* 基因的原位雜合的結果，Fig.8A、C 為野生型果蠅胚胎（C 圖為 A 圖的局部放大圖））Fig.8B、D 為 *tinman* domain negative expression 的果蠅胚胎（D 圖為 B 圖的局部放大圖）顯示此時的 *Him* 基因於中胚層表現明顯因為 *tinman* 於中胚層的功能受到抑制而減少，到了晚期，原本在野生型果蠅的心臟細胞可以發現 *Him* 的表現，此時在 *Tinman* domain negative form protein 的表現下，心臟細胞的數目變少，而 *Him* 的表現與野生型對照來看亦明顯減少(三角箭頭所指) 因為將 *tinman* domain form 表現在中胚層（*tinman* 不表現於外胚層）而原本 *Him* 基因在外胚層的表現是不受影響的（箭頭所指）這顯示 *tinman* 在中胚層間接或是直接的調控 *Him* 基因晚期在果蠅心臟的表現。

Pannier domain negative expression in mesoderm

由於含 repressor domain 的 *Pannier* 蛋白質在中胚層大量表現，間接造成抑制 *Pannier* 在中胚層的功能，圖為 *Him* 基因的原位雜合的結果，Fig.9A、C 圖為野生型果蠅胚胎(C 圖為 A 圖局部放大圖) fig.9B、D 為 *Pannier* domain negative form 表現於中胚層，(D 圖為 C 圖的局部放大圖) 目前已知若在 *pannier* 基因的突變遺傳背景下，果蠅心臟細胞中的心肌細胞 (myocardial) 及圍心細胞 (pericardial) 的數目會受到抑制(Alvarez et al., 2003)，在此遺傳背景底下，*Him* 基因在心臟

細胞的表現與野生型果蠅來比較，亦是受到抑制的（三角箭頭所指），因為將 *pannier* domain form 表現在中胚層（*pannier* 亦表現於外胚層），而原本 *Him* 基因在外胚層的表現則不受影響的（箭頭所指）。這顯示著 *Pannier* 在中胚層間接或直接調控著 *Him* 基因晚期發育在果蠅心臟的表現。

3. 缺失、重複突變果蠅的免疫組織染色

從 Alberto 取得一株 deficiency Df(1)22622DL 果蠅，由於此 deficiency 為一顯性的突變株，為使得此株果蠅存活，所以此 deficiency 果蠅需要以一 duplication DP(1;3)JC153 維持住，因為此處 deficiency Df(1)22622DL 介於 T(1;Y)W32 及 T(1;Y)V7 這兩個斷裂點（breakpoint）之間約 170kb，而 duplication DP(1;3)JC153 為 550kb，此 deficiency Df(1)22622DL 缺失的片段被 duplication DP(1;3)JC153 所補回，故此株果蠅可以得到三種型態的外表型即：

Df(1)22622DL/ Df(1)22622DL、Df(1)22622DL/ DP(1;3)JC153、DP(1;3)JC153/ DP(1;3)JC153，收集果蠅胚胎於 stage 7 ~ stage 16，固定以 anti-*Dmef2* 抗體染色，*Dmef2* 標定了肌肉細胞及心肌細胞，發現染色的果蠅胚胎分為三個族群（Fig.10），此以基因型的推論結果是類似的，第一個類型：肌肉細胞及心肌細胞均無缺失存在，與正常的 *Dmef2* 表現於胚胎的位置及時間一致，第二類型：肌肉細胞

於 germ band extension 時缺失，肌肉細胞數量少及位置也不對，有的胚胎即使發育到末期肌肉細胞是正常的但心肌細胞卻是減少的。

第三類型：germ band extension 早期肌肉細胞的發育是正常的，到了晚期也無缺失發現，但卻可以發現晚期的心肌細胞變多，且心肌及其以下的肌肉系統，部分無法正常分開，雖然可以將染色的胚胎分為三群但無法分辨其單獨個別的遺傳背景。

4.Him 基因加強表現及 RNA 干擾基因功能缺失的抗體染色

使用果蠅株 *twi-24B-Gal4* 與 *UAS-Him* 果蠅株交配驅動 *Him* 基因在中胚層過度及異位表現在中胚層作果蠅胚胎的抗體染色，及果蠅株 *twi-24B-Gal4*、*tubulin-Gal4* 與 *Him pWIZ* 果蠅株交配使其於中胚層及全身過度表現 *Him* 基因 exon-1 的雙股 RNA，在中胚層產生 RNA 干擾現象，使 *Him* 基因產物分解，間接造成 *Him* 在中胚層的功能缺失(Kim et al., 2004; Lee and Carthew, 2003; Yuan et al., 2002)，以各種果蠅心臟的分子標誌 *Dmef2*、*Tinman* 作染色，鑑定 *Him* 基因增多或缺失對果蠅心臟造成的影響。

***Dmef2* 抗體染色**

使用 *DMef2* 作抗體染色，在 *Him* 基因的缺失果蠅胚胎中可發現晚期的心肌細胞部分區域有增多，且心肌及肌肉有濃縮擠壓在一起 (Fig.11 B 箭頭所指)，而相反的在 *Him* 基因過度表現的情況下，心

肌及肌肉系統缺失減少，且無法適當的移動到正常的位置（Fig.11C 箭頭所指）A 圖為野生型正常情況的 *DMef2* 染色，以這三種染色所得的結果，剛好可以與從 Alberto 所得的果蠅株作比對，此株果蠅染色如上所述可以得到三種性狀，其三種性狀，與這次的結果相符，顯示在 Deficiency mutant and Duplicated mutant 的果蠅所看到的肌肉缺失的外表型屬於 Duplicated mutant，而心肌增多的外表型屬於 Deficiency mutant。

***Tinman* 抗體染色**

使用 *Tinman* 作抗體染色，在 *Him* 基因缺失的果蠅株得到 *Tinman* 的 myocardial cells 及 pericardial cells 增多 (Fig .12B)，而相反的在 *Him* 基因過度表現的情況下，*Tinman* 的 myocardial cells 及 pericardial cells 卻是有部分減少的現象 (Fig.12C)，此部分亦與上述的 *Dmef2* 結果相類似。

5.*Him* 基因的 heart enhancer 尋找

從 Genomics Division of Lawrence Berkeley National Laboratory 的

VISTA tools，比對已定序完成的 *Drosophila melanogaster* 及

Drosophila pseudoobscura 兩株果蠅株的 *Him* 基因本身及上下遊的基因組序列，發現除 *Him* 基因本身在兩種果蠅間有高度保守性（*Him* 基因有兩個 exon，保守範圍多在靠 N 端及 C 端位置），基因組序列

在五端上游有一段區域具有高度的保守性，推測此一段序列可能具有 enhancer 的功能性 (Fig.13)。

利用 Gene palette 1.04 軟體搜尋 *Him* 基因的五端上游區域的與心臟發育調控相關的轉錄因子 *Twist*、*Tinman*、*Pannier*、*DMef2* 的 consensus sequence，發現可能的位點有 *Twist*：8 個，*Tinman*：4 個，*Pannier*：2 個，*DMef2*：2 個，與 fig.14 的五端上游保守區域比對，總共有 *Tinman*：3 個，*Pannier*：2 個，*DMef2*：2 個是具有保守性的 (Fig.14 劃紫色線條部分) 附圖十為兩種果蠅五端上游保守區域的序列比對，標色塊為不同轉錄因子的 consensus sequence。

根據序列比對及轉錄因子預測的結果先後設計不同引子，將 *Him* 基因五端上游的片段從果蠅基因組 DNA 夾出，並置入 pH-stinmanger 質體，作轉殖株果蠅：*Him en-1*、*en-2*、*en-3*、*en-1-1*、*en-1-2*、*en4.0 kb* 及 *en 2.2kb* 兩株果蠅(為 Posakony Lab 所贈)其相關序列位置及所包含的轉錄因子標示如 Fig.15，使用共軛焦顯微鏡觀察果蠅胚胎於 stage 7~stage 17 的報導基因 eGFP 表現的時間及位置，由報導基因表現情形來看，所得到的七個不同片段基因轉殖果蠅，其報導基因 eGFP 在心臟有表現的總共得到六株，證明 *Him* 基因的五端上游位置的確具有表現於心臟的 enhancer 存在，且其最小範圍控制 *Him* 的 heart enhancer 可能包含於其中，一一觀察各株轉殖果蠅胚胎發育各

時期報導基因 eGFP 的表現時間及位置來看，從包含最大片段的轉殖株

Him 4.0 kb 其片段包含了 *Him* 基因五端上游 4.0kb 的片段對照 Genepalette 軟體搜尋果蠅心臟發育相關的轉錄因子的接合位的結果 (Fig.17)，可以發現發現可能的位點有 *Twist*：8 個，*Tinman*：4 個，*Pannier*：2 個，*DMef2*：2 個，根據 Rebeiz 等人的推測此片段的前端有四個 *Suppressor of Hairless* 的接合位點，此基因在沒有 *Notch* 接合的情況下，扮演一個轉錄的抑制子的功能，當有胞內 *Notch* 接合時，其角色轉化為轉錄因子的功能，而其啟動的基因常為在基因調控的過程扮演抑制的功能，在發育上，常常參與著細胞的不對稱分裂的作用 (Rebeiz et al., 2002)，此株轉殖株約於 stage 9 開始表現於 trunk mesoderm primordium、隨著時間的推演，在 stage 11~12，germ band extension 及 germ band retraction 開始侷限表現於 dorsal mesoderm，到了 stage 14 開始進行 dorsal closure 此時期主要表現在肌肉系統及心臟細胞，stage 15 當 dorsal closure 完成此時表現在肌肉系統及已經分化的心臟細胞上，disc precursor 及 goand，stage 16 表現侷限於心臟細胞且表現於肌肉系統部分逐漸消失，這個時期若只就心臟細胞的表現種類來看，屬於心肌細胞的部分均有 eGFP 表現即每一體節一側六顆心肌細胞均有表現（此六顆細胞會表現 *Dmef2*）而圍心細胞

方面則是發現每一體節一側緊鄰著心肌細胞有四顆圍心細胞表現若就相關來看應該是表現 *Tinman* 的圍心細胞。

Him 2.2 kb(Fig.18)，此enhancer片段與Him 4.0 kb比較去掉了前端四個*Suppressor of Hairless*的接合位點，此株轉殖果蠅的在中胚層表現的時間位置跟Him 4.0kb轉殖株的表現時間及位置均相同，就晚期表現於心臟細胞的形式亦是一致，在中胚層的表現似乎不像2002年 Rebeiz 等人所發表的Him 2.2 kb轉殖株果蠅與Him 4.0kb會在 adepithelial cell的表現有減少的現象(Rebeiz et al., 2002)。

Him en-1(Fig.19) 此片段包含 Him 基因的 5'上游-2414~-916 包含 Him 2.2kb 片段的前端部分其可能的與心臟相關的轉錄因子包含三個 *Tinman* binding site、兩個 *Pannier* binding site、一個 *DMef2*、兩個 *Twist* binding site、一個 *Dmef2* binding site。其轉殖株果蠅的胚胎的報導基因 eGFP 表現約於 stage 10 開始但其很微弱的在背側中胚層 (dorsal mesoderm) 表現，在 stage 12 時 germ band retraction 在背側中胚層的肌肉系統及心臟先驅細胞表現，但與 Him 4.0 kb 及 Him 2.2kb 相同時間相同位置的表現的強度來看相對微弱許多，到了 stage 15 dorsal closure 時期來看，此時期 eGFP 表現於肌肉系統及果蠅心臟，此時期 eGFP 在果蠅心臟的表現已可看到其表現在心肌細胞的 myocardial cells 就 myocardial cells 的細胞種類來看，兩種 myocardial

cells(*Tinman*-positive、*Svp*-positive)均有表現，此外圍心細胞(pericardial cells)亦有表現但其種類無法判斷，圍心細胞的表現強度比心肌細胞來的強，就肌肉系統表現而言相對於 Him 4.0 kb 及 Him 2.2kb 相同時間相同位置的表現的強度來看相對微弱許多，若與同一胚胎的果蠅心臟表現強度來比，也相對微弱許多。Stage 16 dorsal closure 完成，可以發現在肌肉系統的 eGFP 部分減弱甚至於消失，而果蠅心臟方面在心肌細胞(myocardial cells)也減弱許多，而圍心細胞則維持表現的強度。

Him en 1-1 此片段包含 *Him* 基因的 5'上游-2414~-1591 的位置包含 Him en-1 的前半段其包含與心臟發育調控相關的轉錄因子調控點包括兩個 *Pannier* 及一個 *Tinman* 的 binding site 其基因轉殖果蠅株胚胎未發現 eGFP 的表現，其結果可能是此段片段所包含可能的轉錄因子調控區域並不受到這些轉錄因子的調控，或是若要表現 eGFP 此片段可能需要其他位置的調控區域的協同才能促使 eGFP 在中胚層及果蠅心臟表現。

Him en 1-2(Fig.20) 此片段包含 *Him* 基因的 5'上游-1723~-916 的位置包含 Him en-1 的後半段部分其包含的與心臟發育調控相關的轉錄因子包括：一個 *Pannier*、兩個 *Tinman*、兩個 *Twist*、一個 *Dmef2* 的 binding site，其基因轉殖果蠅株胚胎的 eGFP 如同 Him en 1

在 stage 10 左右微弱的表現於背側中胚層(dorsal mesoderm) stage 12 germ band retraction 時表現於背側中胚層其表現亦是相對微弱，stage 14~15 dorsal closure 表現於背側中胚層的衍生肌肉系統及果蠅心臟先驅細胞，但肌肉系統部分表現相對心肌細胞微弱，到 stage 16 dorsal closure 完成時，果蠅心臟細胞其包含心肌細胞(myocardial cells)每一節一側六顆及圍心細胞(pericardial cells)表現著，但心肌細胞的表現強度向對圍心細胞微弱，肌肉系統部分亦微弱表現，到了 stage 16 更晚期時，肌肉系統的表現慢慢減弱至消失，此時表現較為明顯的是圍心細胞，此株果蠅胚胎表現位置與時間類似於 Him en-1，對照 Him en-1、Him en 1-1 及 Him en 1-2 的表現來看，可能對於此 enhancer 在果蠅心臟的表現是不需要 Him en 1-2 片段部分，亦即此片段包含的 *Tinman* 及 *Pannier* 的調控區部分。

Him en-2(Fig.21)此片段包含 *Him* 基因的 5' 上游 -19~-637 的位置其所包含的與果蠅心臟發育相關的轉錄因子包括一個 *Dmef2*、一個 *Tinman*、五個 *Twist* 的 binding site，果蠅轉殖株胚胎的 eGFP 表現開始於 stage 10 左右，其表現於中胚層部分，但其表現極微微弱，到了 stage 11~12 germ band retraction 時期，表現於背側中胚層(dorsal mesoderm) stage 13~14 dorsal closure 時表現於背側中胚層衍生肌肉系統及心臟細胞部分，其表現較之前的時期增強，stage 16 dorsal

closure 完成此時背側中胚層大致分化完畢，此時 eGFP 表現於心臟細胞的心肌部分，及肌肉系統部分，但圍心細胞卻無表現，此時的 eGFP 表現近似於一個基因 *Dmef2* 的表現，對照其片段可能的調控區域，的確存在於 *Dmef2* 的調控位點，可見此處的 *Dmef2* 確有調控使 enhancer 表現於果蠅心臟及肌肉系統的作用。

Him en-3(Fig.22)此片段包含 *Him* 基因的 5'上游-19~-1723 的位置，其所包含的與果蠅心臟發育相關的轉錄因子包括一個 *Pannier*、三個 *Tinman*、七個 *Twist*、兩個 *Dmef2* 的 binding site 亦即包含 Him en 1-2 及 Him en-2 的所有的片段，此株轉殖果蠅株的胚胎的 eGFP 表現於 stage 11~12 germ band retraction 表現於背側中胚層 (dorsal mesoderm)，stage 13~14 dorsal closure 時表現於肌肉系統及果蠅心臟先驅細胞，stage 15 表現於分化完成的果蠅心臟細胞部分，其表現的心臟細胞種類分別為每一節一側的六顆心肌細胞，及其圍心細胞部分，stage 16 原本表現於肌肉系統的部分逐漸減弱或消失，而只剩下果蠅的心臟細胞部分。Him en-3 表現於中胚層及果蠅心臟部分似乎與 Him en 4.0 及 Him en 2.2 一致，此段 enhancer 可能已包含所有控制 *Him* 基因表現在果蠅心臟及中胚層的所有所需的轉錄因子調控位點。

The expression of *Him* related enhancer in different genetic background

Him en-1 in tinman domain negative background

使用 $\text{twi-24Bgal4} > \frac{\text{tinEnR} \text{ Him}_{-en-1}}{\text{tinEnR} \text{ Him}_{-en-1}}$ ，在此遺傳背景的果蠅下，帶有 *engrailed* repressor domain 的 *Tinman* 會被表現於中胚層，使得 *Tinman* 在中胚層的作用反被抑制，觀察 Him en-1 的 eGFP 表現在此時受到抑制(Fig.23A)，而此段 enhancer 包含大部分的 *Tinman* binding site(三個)，這表示在遺傳的證據顯示這三個 *Tinman* binding site 具有調控 *Him* 基因於中胚層及果蠅心臟表現的功能。

Him en-1 in *Dmef2* mutant genetic background

使用雜交的方式得到 $\frac{\text{Df}(2\text{R})\text{X1, Mef2}[\text{X1}]}{\text{cyo}} \frac{\text{Him}_{-en-1}}{\text{Him}_{-en-1}}$ 果蠅，觀察 Him en-1 轉殖果蠅株胚胎於 *Dmef2* 突變的遺傳背景下，eGFP 表現是否受到影響，可以得到在早期 (stage 12) (Fig.24C)及晚期(stage 16)(Fig.24D)的果蠅肌肉系統的 eGFP 表現受到抑制，但對於果蠅晚期心臟部分，也有部分抑制的現象，但效果並不醒目，所以此段 enhancer 含有一個 *Dmef2* 的調控區域，對於 *Him* 基因在中胚層部分的表現是有作用，但對於晚期心臟的部分，卻非主要的調控因子。