

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 探討斑馬魚 mef2c 對 Irx11 基因的調控關係
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 李孟瑋
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-029-B
研究期間： 100年07月01日至101年02月28日止，計8個月
指導教授： 潘惠錦

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 101年03月30日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : 探討斑馬魚 Mef2ca 對 *Irx11* 基因的調控關係 *
* 名稱 *

執行計畫學生：李孟璋

學生計畫編號：NSC 100-2815-C-040-029-B

研究期間：100年7月1日至101年2月底止，計8個月

指導教授：潘惠錦教授

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：

中華民國 年 月 日

Abstract

Irx11 為一廣泛存在於各物種中的新穎homeobox基因，在TALE家族中其homeodomain與IRO最為相似。目前已知小鼠的*Irx11*表現在體節、間葉細胞、肌母細胞及軟骨細胞中，在腳趾、腳掌中的表現與*Sox9*、*scleraxis*相似。我們以斑馬魚來探討*Irx11*在胚胎發育上的調控機制，先前已選殖出斑馬魚的*Irx11*，並發現它在胚胎的表現位置主要為咽喉鰓弓，而在成魚組織則廣泛表現。*Irx11* knockdown後，胚胎下顎軟骨組織嚴重缺失，顯示其可能與下顎軟骨發育有關。在本計畫中，我們想進一步找出調控*Irx11*的機制。首先我們利用生物資訊的方法，預測*Irx11*轉錄調節區域可能結合的轉錄因子，結果顯示*Irx11*序列上游有*Mef2c*的結合位置。在先前文獻中指出，小鼠和斑馬魚的*Mef2ca*與咽喉鰓弓及下顎軟骨發育有關，因此，*Mef2ca*有可能參與*Irx11*在下顎軟骨發育的調控。我們抑制斑馬魚內生性*Irx11*或*Mef2ca*，發現下顎軟骨發育皆為異常，與利用不同胚層的marker觀察下顎，例如：*Sox9b*、*Snail2*、*Dlx2*、*Sox9a*，其Morphants型態也非常相似。此外也發現利用*Irx11* cRNA無法回覆*Mef2ca* Knockdown造成之軟骨異常型態，但可以回覆*Mef2ca* Knockdown造成的肌肉異常。因此我們推測*Irx11*與*Mef2ca*在軟骨調控途徑可能是平行調控，但在肌肉發育過程中*Mef2ca*可以影響*Irx11*表現進而促使肌肉正常分化。為了確認*Mef2ca*可直接調控*Irx11*，我們將*Irx11*基因上游序列-1342/+951及其縮短片接於Firefly Luciferase報導基因前，與*Mef2ca*-MO共同注射至斑馬魚胚胎分析*Luciferase*活性，並設計突變點以確認*Mef2ca*的結合位置。進一步藉由酵母菌單雜合法的方法，我們證實*Mef2ca*與*Irx11* promoter之間有直接結合。因此，*Irx11*可以被*Mef2ca*直接調控而參與下顎肌肉的發育。

Introduction

Irx11 為一新穎基因，具有homeodomain，而Homeobox gene的共同特徵為含有由180個高度保留的核苷酸序列組成，可轉譯出60個胺基酸的轉錄因子的homeodomain，為一個能與DNA結合的helix-turn-helix 蛋白質，作用在promoter region，進而調控其下游基因。Homeobox gene在真菌、動物、植物皆具有演化保留性，它能藉由時間、空間與組織的特異性的方式，來調控胚胎發育，包括體軸形成、器官生成、體節分節、側肢發育等。而Homeobox gene除了與胚胎發育極為相關外，也發現與癌症的生成有關，例如：若有不正常的調控會導致神經母細胞瘤、Currarino syndrome、血癌、惡性腫瘤等疾病 (Mukherjee. et al., 2007)。

含有homeodomain的蛋白質為一龐大的蛋白家族，其中TALE (three-amino acid-loop extension)為非典型的homeodomain家族，而 Iroquois (Iro/Irx)家族屬於非典型的TALE家族。最早在果蠅中找到的araucan(ara)、caupolican(caup)、mirror(mirr)，及IRX genes等皆屬於該家族。其蛋白質C端具有13個胺基酸序列高度保留的acidic motif，稱為IRO Box。*Irx* genes主要是涉及中樞神經系統、心臟、體節、性腺、軟骨等部位的發育，調控proneural genes，進一步影響神經管前後與腹背形成(Lecaudey. et al., 2005)。而*Irx*家族分別在不同時間與空間調控頭部區域：如中膩、後膩、小膩及耳石、嵴索、界線及rhombomeres的形成、以及體節尾端等 (Lecaudey. et al., 2005)。

最近在小鼠發現一homeobox gene，因其分類與Irx最為相近，因此命名為Iroquois homeobox-like 1 (*Irx11*) (Takeuchi. et al., 2007)，在其它文獻中則命名為*Mkx* (Anderson. et al., 2006)。*Irx11*在斑馬魚、和河豚、青蛙、小鼠中具有同源關係。*Irx11*在小鼠胚胎發育8.5天(E8.5)就表現在體節，於E9.25表現更加強烈，在發育後期則表現在體節的中胚層(尤其是軸前、軸後區域)。側肢形成時，也有表現在移動的肌母細胞、骨質形成中心周圍的軟骨細胞、指間相連的間葉細胞、心室的心肌細胞、頭蓋骨的間葉細胞、散布在神經以及圍繞在嵴索周圍的間葉細胞。由全胚體原位雜交法來看，可以發現*Irx11*在腳趾、腳掌中皆有表現，與*Sox9*、*scleraxis*相似；從腳趾的橫切面來看，則可以發現*Irx11*與*Sox9*的表現位

置有互補的現象；在雄雌性的性腺也可以發現與*Sox9*的表現類似(Takeuchi. et al., 2007) ，近年也有研究指出，在MKX^{-/-}小鼠的膠原纖維(collagen fiber) 直徑較小和第一型膠原蛋白(collagen type I)在肌腱(tendon)的表現量降低，這顯示MKX可能在肌腱的分化扮演很重要的角色(Toriuchi, et al., 2010) 。這些觀察暗示*Irx11*可能參與這些位置發育的調控路徑。有文獻指出，*Twirler (Tw)*的突變鼠，若是異型合子會造成內耳缺失，同型合子則會造成唇裂。而*Irx11*是位於*Twirler* locus的基因之一，其表現在內耳發育的間葉細胞及下顎，因此*Irx11*極有可能是*Tw*的候選基因(Takeuchi. et al., 2007) 。

先前實驗室已在斑馬魚系統中選殖出*Irx11* cDNA，將之與基因體資料庫作序列比對，結果顯示*Irx11*位於第12條染色體。*Irx11*從胚胎時期18小時開始表現，並一直持續至5天、且廣泛表現於成體的組織中，包括：臍、眼睛、肌肉、卵巢、睪丸與鰓等；也用全胚胎原位雜交以及免疫螢光染色觀察到，*Irx11*主要表現在咽喉鰓弓的部位。利用morpholino knock down *Irx11*後的胚胎，會造成臍部型態發育異常，以及咽喉鰓弓、中胚層與軟骨組織型態發育異常。抑制*Irx11*轉譯功能會造成咽喉鰓弓肌肉與頭部神經嵴細胞數目減少，但若共同注射*Irx11* cRNA則缺陷部分可得到恢復。軟骨染色結果顯示下顎軟骨組織嚴重缺陷(Chuang., 2010)，此情況與小鼠的*Twirler* mutation 顎裂之外表型(Takeuchi. et al., 2007) 非常相似，顯示*Irx11*基因可能會參與下顎形態發育(Cheng., 2007) 。

*Mef2c*是第一個在MEF2(myocyte enhancer factor 2)家族中表現的，是一與咽喉鰓弓發育有關的基因，已知小鼠的*Mef2c*表現在肌肉細胞、軟骨細胞、顱骨、神經嵴細胞及心臟血管的發育等，且已經知道 *Mef2c* 可以調控*Dlx5/6*，*DLX5/6*又可以調節 *Hand2* (Verzi., Agarwal., 2007)。而 *Mef2c (Mef2ca)* 在斑馬魚則是表現在頭蓋骨的神經嵴細胞CNC (與咽喉鰓弓型態發生有關)和體節。比較魚與小鼠 *Mef2c (Mef2ca)* 的表現位置相似、下游也有類似的基因(Miller., 2007) 。先前有文獻指出利用morpholino將內生性*Mef2ca*抑制產生的Morphants，其頭蓋骨會與knockdown endothelin1 (edn1)的胚胎類似，其下游一些參與*edn1*途徑參與下顎軟骨發育的基因 *Hand2*、*Bapx1*、*Gsc*、*Dlx* genes，這顯示出神經嵴是需要*edn1*下游的*Mef2ca*一起調控顱面發育的形成。實驗室先前已經知道*Irx11*會影響*Dlx2*的表現，在文獻中我們也看到*Mef2ca*會調控*Dlx* genes，令人驚訝的是*Dlx3*

與*Dlx4*受到*Mef2ca* mutant 影響是相反的，*Dlx3*在神經嵴的表現量會增加而*Dlx4*是減少(Miller., 2007)。

*Mef2c*從16~19小時開始表現，且*Mef2ca*^{tn213/tn213}可以看到咽喉鰓弓的軟骨異常情形(附圖一)與*Irx11* morphant極為相似。用全胚體原位雜交法和RT-PCR都觀察到，*Mef2ca* knock down後的*Irx11*的表現量下降，嚴重的甚至不表現*Irx11* mRNA(附圖二、三)。另外，將*Irx11* pr. -1342/+951序列輸入PROMO網站搜尋可能的轉錄調控因子，並參考它們已知的表現位置及時間，發現有兩個*Mef2c*的結合位，而目前我們也推測*Irx11*可能參與*Mef2c*對咽喉鰓弓軟骨發育的調控途徑。因此我們想要探討*Mef2c*是否調控*Irx11*的表現，並找出*Mef2c*在*Irx11* pr.的調節區域、結合序列以及調控的途徑。

Rationale

Irx11 為一新發現的homeobox gene，廣泛存在於各物種間。先前實驗室利用斑馬魚來探討*Irx11*在胚胎發育的調控。利用全胚體原位雜交的方式，發現在胚胎時期主要表現在咽喉鰓弓。*Irx11* knock down後，可以發現胚胎下顎軟骨組織嚴重缺失，且由*Dlx2*、*Wnt1*、*Krox20*、*Nkx2.3*、*MyoD*、*Sox9a*等基因的表現暗示這些基因可能直接或間接的受到*Irx11*的調控(Chuang., 2010)。在發育的過程中神經嵴細胞會遷移到咽喉鰓弓，神經嵴細胞對脊椎動物的顱面發育很重要，它會產生頭部及咽喉鰓弓的結締組織及骨骼。利用*Snail2* (*Snail1b*)和*Sox9b*當作早期神經嵴的標記，我們觀察到早期*Irx11* morphants胚胎的神經嵴細胞在形成和移動有異常，進而使咽喉鰓弓有缺失的情形(Chuang., 2010；Trainor, 2005)。

從全胚體原位雜交與頭部軟骨染色的結果裡，我們推測斑馬魚*Irx11*會參與臉部型態及下顎肌肉與軟骨的發育。從文獻已知*Mef2c*為一與咽喉鰓弓及下顎軟骨發育有關的基因。小鼠及斑馬魚的*Mef2c*(*Mef2ca*) 都會在神經嵴的位置表現，且有類似的下游基因。斑馬魚*Mef2ca* knockdown後，咽喉鰓弓的軟骨異常情形與我們觀察到的*Irx11* morphant表型極為相似，加上利用生物資訊的方法發現*Irx11* pr.的區域有2個 *Mef2c* 的結合位置，又藉由全胚體原位雜交法的結果，發現*Mef2ca*可以影響到*Irx11*的轉錄。我們推測*Mef2ca*可能是*Irx11*的一個上游調控因子，因此我們將利用酵母菌單雜合法、雙冷光素酶活性分析(Dual-luciferase reporter assay)、PCR與全胚體原位雜交法(Whole-mount in situ hybridization, WISH)等技術，進一步了解 *Irx11*上游的調控機制。另外，利用目前已知*Mef2ca*調控下顎軟骨的途徑，進一步探討*Irx11*是否也參與其中或藉由調控肌肉生長去影響軟骨的發育。而之前實驗室經由RT-PCR的實驗已排除了*Irx11* 不會藉由在小鼠發現 *Mef2c*調控*Dlx5*與*Dlx6*去調節*Hand2*進而使顱面發育的途徑(Verzi., Agarwal., 2007) 影響下顎軟骨(附圖四)。

研究問題：

1. *Mef2ca*與 *Irx11*是否會參與同一條途徑去調節咽喉腮弓發育？
2. *Mef2ca*是否可透過*Irx11* pr.上的調節區域來調控*Irx11*的轉錄活性？
3. *Mef2ca*是否可直接與 *Irx11* pr.序列結合？
4. 若有調控關係，則*Mef2ca*的調節區域與結合序列為何？

Material and Method

1. 斑馬魚之飼養與胚胎操作

A. 斑馬魚(Danio rerio)之飼養與維護

野生型斑馬魚(AB strain)，飼養於28.0°C恆溫系統中，日夜週期為光週期14小時與暗週期10小時，並以適量豐年蝦與人工飼料餵食。

B. 胚胎之培養與收集

暗週期開始之前，將斑馬魚置於寵物箱中，並用網欄隔離公母魚，公母魚的比例為一比一，隔日光周期開始後，進行配種工作，待公母魚交配後收集濾網下之魚卵。將魚卵放入含有egg water (60 g/ml sea salt)之培養皿，置於28.0°C恆溫箱中培養，依照斑馬魚胚胎發育時期，收集不同階段之胚胎。胚胎先以PBS清洗，再以4% PFA/PBS於4°C冰箱中固定隔夜，固定完成之胚胎依次以25%、50%、75% Methanol/PBST處理，最後將胚胎置於100% Methanol，保存於-20°C冰箱中。若胚胎之卵膜尚未自然脫去，則須先將卵膜剝除，再進行脫水保存工作。

2. 顯微注射morpholino (MO)抑制內生性的基因表現

我們所設計的*Irx11* MO 其位置在轉錄起始點附近(-17~+8)。先前已有文獻指出，注射MO 會誘發非專一性胚胎神經的細胞凋亡，而共同注射1.5倍的*p53* MO則可抑制這現象，因此現在使用1 pmole *Irx11* MO 加 1.5pmole *p53* MO/2.3nl，在受精後1~2 個細胞時期共同注射至胚胎卵黃中。

3. 斑馬魚之軟骨染色(Alcian blue staining)

將保存於 MeOH 的 120hpf 胚胎，覆水置 PBS 在加入 0.1% Alcian Blue (溶於 80% ethanol/20% glacial acetic acid) 室溫 16hr 後再浸泡置 90% ethanol/10% glacial acetic acid 5min 室溫 5 分鐘，接著進行漸進式的 wash 到 PBS。利用 0.05% Ttysin/sodium tetraborate 將胚胎變透明，作用時間室溫 1~3 小時。利用 PBS 清洗 5 分鐘三次，再用 15% H₂O₂ : 1% KOH= 1 : 1 漂白 3~4 小時，之後用 PBS wash 5 分鐘三次，利用 4% PFA fix O/N or RT 4hr，最後進行顯微觀察。

4. 探針的製作

將 marker gene 利用酵素切切成線性，膠回收完取出 Template (100~200ng)、DTT (Roche)再加入 Rnase (Rnase inhibitor; invitrogen) 、10 X Dig-RNA labeling Mix (Roche) 和 T7 (50U) 或 SP6 (20U) polymerase (promega) ，將以上混合物放置 37°C 2 小時合成 RNA probe。利用 DNase 將 Template DNA 去除，之後進行酒精沉澱後，加入 15 μ l DEPC 水回溶，再以 15 μ l formamide 解二級結構，保存在-20°C。

5. 雙色原位雜交 (Two color in situ hybridization)

將胚胎以4% PFA/PBS固定4°C 隔夜，固定後將胚胎的卵膜脫除再依25%、50%、75% methanol in PBS完全脫水於100% methanol，保存在-20°C。開始做全胚體原位雜交法時，先用25%、50%、75% PBST in methanol將胚胎覆水至100% PBST後，先將HYB⁻、HYB⁺ pre-warm後，依序用HYB⁻、HYB⁺進行 pre-hybridization 5分鐘及2~4小時。加入含100~200ng for Fluorescein-labeled probe之HYB⁺進行hybridization overnight。隔天，用25%、50%、75% 2XSSCT in HYB⁻漸進式將胚胎洗至2X SSCT，再換0.2X SSCT 1小時2次，將非專結合的RNA洗去。用blocking solution覆蓋住胚胎中會非專一性結合的蛋白，使用經過 pre-absorb anti-fluorescein AP抗體反應。接著以detection solution浸潤胚胎，利用受質NBT/BCIP in detection solution避光進行呈色反應，呈色完用100% 甲醇脫色，再加入含100~200ng dig-labeled probe之HYB⁺進行hybridization overnight。給予FastRed in 0.1 M Tris-HCl pH 8.2.避光進行呈色反應。呈色完後用PBST/DEPC脫色，再以4% PFA/PBST固定。拍照時將胚胎放在50% 甘油以提高透光度。

6. 酵母菌單雜合法(Yeast one hybrid)

A. 醋酸鋰酵母菌轉形實驗(LiAc Yeast Transformation)

首先從-80°C所保存的出芽酵母菌菌株(W303 α strain)中，取一點菌液於YPD固態培養基上劃開，並置於30°C培養箱中，培養一至兩天，待其單一顆菌落長出。接著挑出單一顆菌落種於含有2 ml YPD 液態培養液的養菌管中，於30°C中培養至隔日。隔天，將此2 ml 的菌液置於50 ml 的YPD 液態培養液裡，於30°C中培養至OD₆₀₀ 之值約為0.6(大約需要五至六個小時的培養時間)。待

OD₆₀₀ 之值到達0.6 後，將菌液分裝至50 ml 的高速離心管中，便以3000 rpm 離心五分鐘。接下來，將上清液去除，並每管加入10 ml 的無菌二次水清洗一次，再離心3,000 rpm 五分鐘，然後將上清液去除，每管pellets 各加入1 ml的1x TE/LiAc (100 µl 10x TE + 100 µl 10x LiAc + 800 µl d₂H₂O)回溶，並使其均勻懸浮。接著將此已經醋酸鋰處理過的W303α，以100 µl 分裝成一管，成為一份的轉形樣本。取1~5 µg 欲轉形的DNA 片段，加入於10 µl 10 mg/ml 的ssDNA /salmonsperm DNA (使用前先分裝欲轉形的數量於PCR 試管當中，每份轉形樣本需100 µg，於PCR 機器中以95°C 十分鐘，4°C 十分鐘，4°C ∞處理，使其denature 成單股形式，並於4°C 中保持其單股的形式)當中，稍微混合均勻，至於冰上，待酵母菌轉形所用。配製40% PEG3350 / 1x TE / 1xLiAc，每份轉形樣本需700 µl (560 µl 50% PEG3350 + 70 µl 10 xTE + 70 µl 10xLiAc)。待經醋酸鋰處理過的酵母菌，欲轉形的DNA 和ssDNA 混合液，以及40% PEG3350 / 1x TE / 1x LiAc 溶液準備好後，將一份的欲轉形之DNA 和ssDNA混合液，加進一份的經醋酸鋰處理過的W303α，接著再將一份的40% PEG3350 / 1x TE / 1x LiAc 溶液置入進去，稍微震盪一下，放於30°C 培養箱中震盪培養。一小時後將其換至42°C 熱休克十五分鐘，結束之後再快速離心五秒鐘，將上清液去除掉，接著再快速離心五秒鐘，去除剩餘的PEG等物質，而留下菌體；最後加入100 µl 的二次水回溶，並利用過火和冷卻過的玻璃棒，將菌液塗於可篩選用之固態培養基上，然後置於30°C 培養箱中培養四到五天。

B. *Mef2ca*對*Irx11* pr. -517/-389的調控

先建立*Irx11* pr.的construct到帶有reporter gene的質體(例：pYoh366)，再將切成線性的質體transform到酵母菌(W303αstrain)中，利用適當的培養基篩選出成功integrate到酵母菌染色體中的菌落。另外，將我們的蛋白*Irx11*與*Mef2ca* construct到可轉錄出GAL4 activation domain的質體(例：pYoh-1)，同樣將質體送入酵母菌中，若hybrid蛋白能與promoter序列結合的話，會啟動下游reporter基因的活化(例：Histidine)，而產生Histidine胺基酸，則可選用缺乏此種胺基酸的培養基進行篩選，進而證實兩者是否有結合。

- W303α (0.5 ml) Genotype is MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-901, tyr1-501, gal4-D512, gal80-D538, ade5::hisG (Liu et al., 1993; Wilson et al., 1991).

7. 以生物資訊分析序列，尋找Mef2c可能會結合在*Irx11*的位置

將斑馬魚*Irx11*上游1kb 序列以BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project)網站的NNPP (Neural Network Promoter Prediction) 分析軟體作預測。與可結果顯示斑馬魚*Irx11* pr.-1342/+951序列上游有四段可能為轉錄因子結合區域。接這再利用生資網站PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) 將*Irx11* pr.-1342/+951加以分析，觀察可能與*Irx11* pr.的轉錄因子有哪些。

8. 斑馬魚胚胎Genomic DNA 的萃取

取100 隻24小時的胚胎，加入500ul genomic lysis solution (20mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 100mM EDTA pH8.0, 1% SDS)，接著再加入8.3ul 2-Mercaptoethanol 以及1ul proteinase K (10mg/ml)，於60°C 水浴反應直到溶解後，加入500ul phenol chloroform，並翻轉數次混勻反應，靜置10分鐘後再離心13000 rpm 10分鐘，取上層至新的tube中。酒精沉澱，加入100%酒精，翻轉tube直到絲狀出現，即可離心3000 rpm 15 秒，去上清液後，加70%酒精洗掉鹽類，再離心3000 rpm 3分鐘，去上清，等酒精揮發後，即可加200ul ddH₂O 回溶。

9. 斑馬魚*Irx11* pr.及Mef2c的選殖

Irx11 pr.的選殖方法：此質體目前已經建構完成。首先抽取斑馬魚的Genomic DNA，設計一對兩端都設計*NheI*切點的primer(附表二)，並進行PCR，再將PCR產物(2293bp)接到pGEM-T Easy Vector中，並定序以確定為完整的序列。將pGEMT-*Irx11* pr. 和pGL3-Basic Vector以*NheI*進行酵素切，再以連結酶進行接合即構築好質體。另外，將斑馬魚*Mef2ca*基因(cDNA)選殖入pCS2+的vector中。

10. 雙冷光素酶活性分析(Dual-luciferase reporter assay)

a. 顯微注射

將pCS2⁺-*Mef2ca*和pGL3- *Irx11* pr.以及pRL-CMV pr.共同注射到一至二個細胞時期的斑馬魚胚胎中。另一組實驗則將*Mef2ca*-MO和pGL3- *Irx11*pr.以及pRL-CMV pr.注射入一至二個細胞時期的斑馬魚胚胎中。pRL質體帶有表現Renilla luciferase以及TKpromoter的基因，會持續表現Renilla luciferase，作為對照組來測試斑馬魚*Irx11* promoter之活性。

b. 控制組與實驗組

上述二組實驗皆需包括(1) pGL3-*Irx11* pr. only (2) pGL3-*Irx11*pr.+ pCS2⁺ 或 pGL3-*Irx11*pr. + control MO 作為對照。取注射後24小時的胚胎來偵測冷光的活性。

c. 調控結合位

設計對應*Irx11* pr.的primer，經由PCR製造一系列逐漸縮短長度的*Irx11* pr.序列，選殖到pGL3 vector中。同樣以上述方式注射到斑馬魚胚胎，分析冷光的活性，以找尋Mef2ca在*Irx11* pr.上可能的調控區域。

Result

A. *Irx11*和*Mef2ca* morphant在下顎軟骨表型極為相似

先前實驗室的研究指出*Mef2ca*與*Irx11*都會影響咽喉腮弓的發育，而我們進行*Mef2ca*和*Irx11*的雙色原位雜交實驗觀察到此兩基因表現位置有重疊現象(圖一)。

為了探討基因於胚胎發育時期所扮演的角色，我們利用顯微注射反意RNA morpholino oligonucleotide (MO)來阻斷其RNA轉譯成蛋白質，造成其蛋白的缺陷，觀察注射MO後所產生的胚胎(morphant)其表現型，可推測此基因在胚胎發育上之功能。先前實驗室發現注射*Irx11* MO 的胚胎其morphant第二對下顎軟骨明顯有缺失(Chuang, 2010)，而在利用*Mef2ca*-MO knockdown後，咽喉腮弓的軟骨異常情形與我們觀察到的*Irx11* morphant表型極為相似(圖二)。

B. 用神經嵴細胞的marker和下顎軟骨的marker觀察*Irx11*和*Mef2ca* morphant調控關係極為相似

神經嵴細胞在建構脊椎動物之咽喉腮弓扮演很重要的角色。為了瞭解*Mef2ca*和*Irx11*是否都在神經嵴細胞發育時扮演調控角色，我們將胚胎顯微注射*Mef2ca*-MO或*Irx11*-MO，再藉由經嵴細胞 marker *Sox9b*、*Snail2b*以及*Dlx2*和下顎軟骨的 marker *Sox9a*來進行全胚體原位雜交實驗，觀察缺少*Irx11*和*Mef2ca*的胚胎對於神經嵴和在第一對及第二對下顎軟骨組織的表現關係。

結果發現以*Sox9b*、*Snail2b*探針染色，神經嵴細胞數目於18hpf、24hpf、48hpf都有減少的狀況(圖三)。而構成咽喉腮弓第一對及第二對的細胞數目也可以藉由 marker *Dlx2*的表現來觀察，其在*Mef2ca*與*Irx11* morphant也會有下降的情形，更嚴重的morphant甚至連要形成後面三對咽喉腮弓的神經嵴細胞也消失(圖四)。另外，我們也利用下顎軟骨 marker *Sox9a*觀察，缺少*Irx11*和*Mef2ca*的胚胎其第一對及第二對下顎軟骨組織細胞都會有減少的形態(圖四)，兩者表現也極為相似。以上結果顯示*Mef2ca*和*Irx11*對於神經嵴細胞形成咽喉腮弓的發育是必需的，且全胚體原位雜交的實驗也說明*Mef2ca*和*Irx11* morphant缺失情形極為相似，因此猜測*Mef2ca*與*Irx11*可能參予相同或平行的途徑去調控咽喉腮弓的發育。

C. *Irx11* 和 *Mef2ca* 參與軟骨生長的途徑

我們藉由注射*Mef2ca*-MO所造成胚胎異常的型態探討可否利用*Irx11a* cRNA回復的實驗證明此兩基因的調節關係。將400 pg/per embryo *Irx11a* cRNA與0.5pmole *Mef2ca*-MO共同注射到斑馬魚胚胎中。於120hpf收集軟骨已發育完全的胚胎，利用軟骨染色實驗觀察morphant之軟骨發育是否有回復的情形。結果發現加入*Irx11* cRNA無法回復*Mef2ca* knockdown所造成顎軟骨的異常(表一)，表示*Irx11*與*Mef2ca*在軟骨發育不是直接調控。

先前文獻指出*Mef2ca*會藉由調控*Dlx3*與*Dlx4*再去影響*Hand2*，共同調節顱面生長發育，而我們進行全胚體原位雜交法觀察*Dlx3*與*Dlx4*這兩種神經嵴細胞marker在*Mef2ca* morphant和*Irx11* morphant之咽喉腮弓位置表現形態，結果發現在*Mef2ca*和*Irx11* morphant對於*Dlx3*表現量比起STD的胚胎較多，而*Dlx4*在morphant有被抑制的現象(圖五)。這與文獻指出*Mef2ca*會去抑制*Dlx3*的表現，但對*Dlx4*表現卻是促進的作用現象(Miller., 2007)有符合。因此目前推測*Irx11*參與軟骨生長發育的途徑是和*Mef2ca*平行的。

D. *Irx11* 和 *Mef2ca* 參與肌肉生長的途徑

我們利用注射*Mef2ca*-MO以及800 pg/per embryo *Irx11a* cRNA到肌肉發螢光的轉殖基因魚MLC (TgMLC:EGFP^{+/+})，結果發現800 pg/per embryo *Irx11a* cRNA會使72hpf *Mef2ca* morphant造成肌肉缺失的情形恢復(圖六)。此外，我們利用*MyoG*與*MyoD*作為肌肉marker，觀察到在48hpf *Mef2ca* morphant其*MyoG*表現量也因為 *Irx11a* cRNA的加入而有回復作用，但*MyoD*卻無明顯改變(圖七)，這顯示出*Irx11*可以被*Mef2ca*直接調控進而透過下游*MyoG*表現參與下顎肌肉的發育生成。

E. *Irx11* pr.序列分析

將斑馬魚*Irx11*上游1kb 序列以BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) 網站的NNPP (Neural Network Promoter Prediction) 分析軟體作預測。結果顯示斑馬魚*Irx11* pr.-1342/+951序列上游有四段可能為轉錄因子結合區域。接著我們利用生資網站分析，發現*Irx11* pr. -1342/+951中有2個*Mef2c*的結合位置，分別位於*Irx11* pr.-1120/-1110與-450/+440，而之後參考此轉錄因子結合位置並選殖出不同長度片段的*Irx11* pr.加以分析。(圖八)

F. *Irx11*和*Mef2ca*之間的調控關係

a. 用RT-PCR與全胚體原位雜交法分析

在RT-PCR的結果顯示，如果將*Irx11* knockdown 的胚胎，其*Mef2ca*表現量不改變，但反過來將*Mef2ca* knockdown的胚胎可以發現*Irx11*表現量有降低現象(附圖二)。利用全胚體原位雜交法可以發現 *Mef2ca* Morphants在咽喉腮弓裡*Irx11*的表現量也是下降，嚴重的Morphants甚至不表現*Irx11* mRNA (附圖三)。

b. 用雙冷光素酶活性分析

為了進一步了解*Mef2ca*是否直接調控*Irx11*，我們使用雙冷光素酶活性分析來證明*Mef2ca*是否可藉由*Irx11* pr.上的putative Mef2c binding site調控*Irx11*基因的轉錄。首先我們將選殖*Irx11* pr.不同長度的片段，其上帶有不同片段的Mef2c binding site，分別接到可以偵測到firefly Luciferase 活性的 pGL3-basic 與 pGL3-pr.質體。pRL質體可以轉譯Renilla Luciferase，用以校正實驗操作的誤差。將這兩種質體一起共同注射到胚胎，在48hpf收下偵測Luciferase 的活性，觀察不同長度*Irx11*pr.的活性。

首先我們使用不同的引子和酵素切方式建構出不同長度的*Irx11* pr. (圖八)利用雙冷光素酶活性分析法分析各個*Irx11* pr.片段的相對活性，結果發現 *Irx11* pr. -1342/+249活性比-1342/+951高出7倍，初步判定*Irx11* pr.+249/+951之間可能有抑制 *Irx11* pr. 活性的抑制子結合位(圖九)。為了探討*Irx11*與*Mef2ca*調控關係，我們將抑制轉譯作用使內生性*Mef2ca*不表現的*Mef2ca*-MO和*Irx11* pr.一起顯微注射到胚胎內，結果發現*Irx11*與*Mef2ca*之間的關係主要為正調控的現象，但如果選殖出來的*Irx11* pr.-452左右的區域被截斷就會形成負調控的趨勢(圖十)，因此猜測*Irx11*與*Mef2ca*之間直接結合調控的區域可能在附近，因此我們做了兩組點突變分別在用生資網站分析的*Mef2ca*結合位上的C450A G448T A446C以及不包含結合位的T452G A451C(圖八)，而之後將此兩種質體顯微注射至胚胎內進一步利用雙冷光素酶活性分析探討*Irx11*基因上*Mef2ca*有意義的結合位置。

G. 利用酵母菌單雜合法測試 *Irx11* pr.與 *Mef2ca* 是否為直接結合而調控

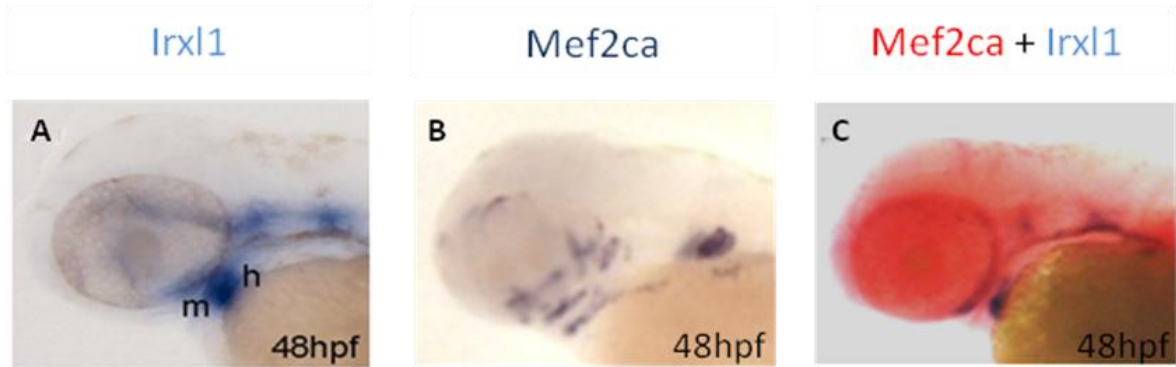
目前實驗室推測 *Mef2ca* knockdown 會抑制 *Irx11* pr. -517/-389 表現，所以我們利用酵母菌單雜合法進一步探討兩者是否為直接結合而互相調控。首先將製備好 *Mef2ca* pYoh-1/pRS313 與 *Irx11* pr.-pYoh366 的質體並分別 transform 到酵母菌 W303 α strain 和 W303a strain，接著利用缺乏-Ura/-Trp /-His 三種胺基酸的培養基進行篩選，結果發現 *Irx11* promoter 與 *Mef2ca* 之間為直接結合關係(圖十一)。

Discussion

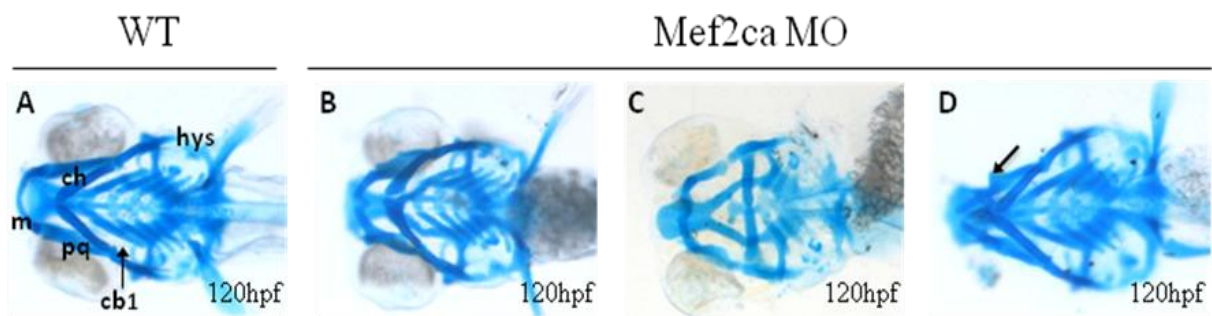
Irx11 為一新發現的homeobox gene，廣泛存在於各物種間，但對於*Irx11*上下游調控機制尚未有任何文獻報告。先前實驗室利用斑馬魚胚胎進行全胚體原位雜交法顯示其表現位置在咽喉鰓弓，我們利用雙色原位雜交看到*Irx11*型態表現與*Mef2ca*有重疊，而軟骨染色實驗也發現胚胎下顎軟骨組織嚴重缺失情形與*Mef2ca* morphants非常相似。咽喉鰓弓軟骨主要來自於神經嵴經由遷移作用而成，透過神經嵴marker *Sox9b*、*Snail2b*以及*Dlx2*與軟骨marker *Sox9a*在全胚體原位雜交法實驗觀察發現*Irx11*與*Mef2ca*於神經嵴以及下顎軟骨表現型態相當密切也很重要。

先前有文獻在斑馬魚已證實 *Mef2ca* 會藉由調控 *Dlx3*與 *Dlx4* 影響 *Hand2* 使顱面發育生成的途徑，我們利用全胚體原位雜交法也發現*Irx11*與 *Mef2ca* morphant 其*Dlx3*表現量在第一二對軟骨有增加，但*Dlx4*的表現量減少，此結果符合預期也說明*Irx11*與*Mef2ca*在軟骨發育調控途徑中可能是平行調控關係。在肌肉部分，我們在轉殖基因魚MLC (TgMLC:EGFP+/-)的實驗中發現注射800 pg/per embryo *Irx11a* cRNA可以使原本*Mef2ca* morphant缺失的肌肉恢復，而利用肌肉marker *MyoG*做的全胚體原位雜交法結果也發現相同的結論，這表示*Irx11*可以被*Mef2ca*直接調控而參與下顎肌肉的發育。

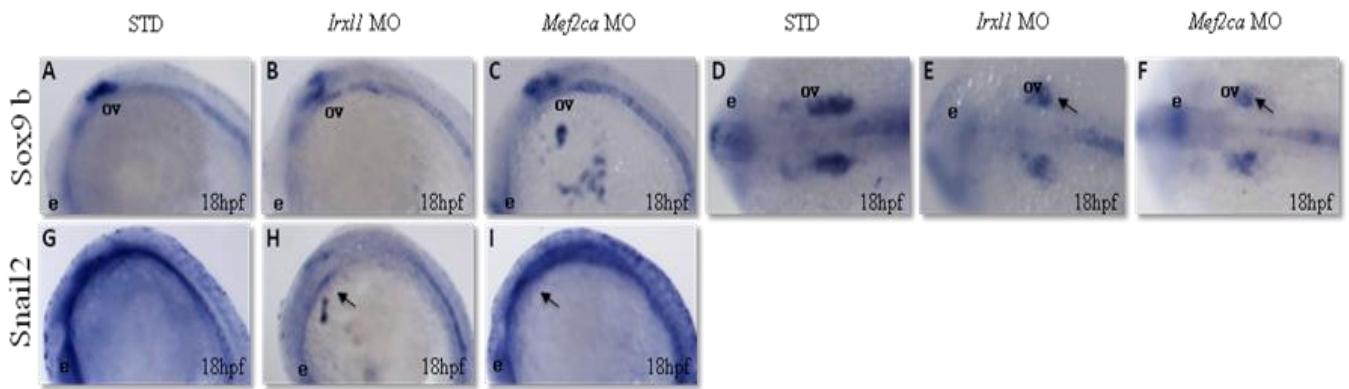
先前實驗室用全胚體原位雜交法觀察到 *Mef2ca* morphant 的 *Irx11* 在 RNA 層次上表現量下降的現象。而我們利用雙冷光素酶活性分析所有選殖出來不同 *Irx11* pr.片段的質體去探討 *Irx11* 與 *Mef2ca* 調控關係，我們將抑制轉譯作用使內生性 *Mef2ca* 降低的 *Mef2ca*-MO 和 *Irx11* pr.一起顯微注射到魚胚胎內，結果發現 *Irx11* 與 *Mef2ca* 之間的關係主要為正調控的現象，但如果選殖出來的 *Irx11* pr.-452 左右的區域被截斷就會形成負調控的趨勢，因此猜測 *Irx11* 與 *Mef2ca* 之間直接結合調控的區域可能在附近，因此我們選殖出兩組點突變之質體分別為生資網站分析的 *Mef2c* 結合位上 C450A G448T A446C 以及不包含結合位的 T452G A451C，之後也將此兩質體進行雙冷光素酶活性分析法去分析觀察 *Mef2ca* 的調節區域與結合序列為何。



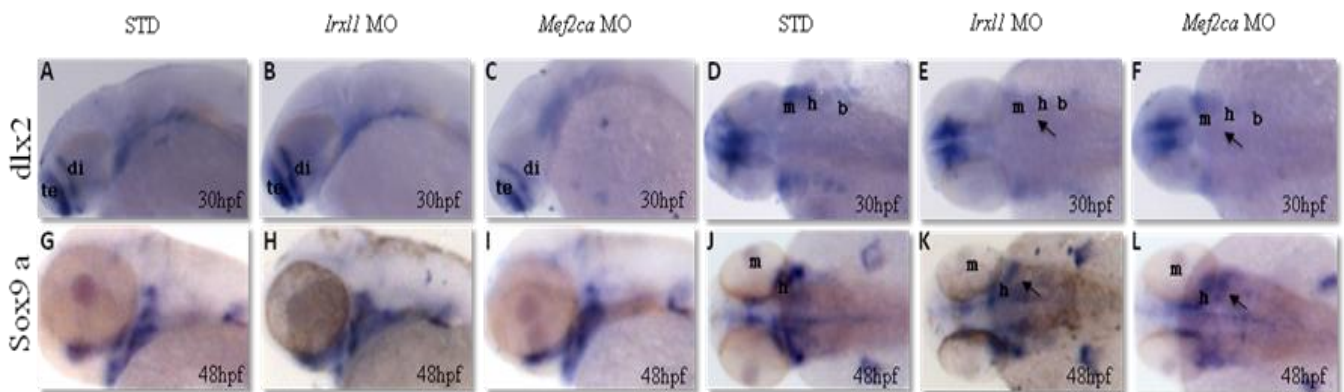
(圖一) *Irx11* 和 *Mef2ca* 表現位置有重疊的現象。利用雙色原位雜交觀察其表現位置在下顎軟骨的位置有重疊的現象(C)。h, hyoid m, mandibular.



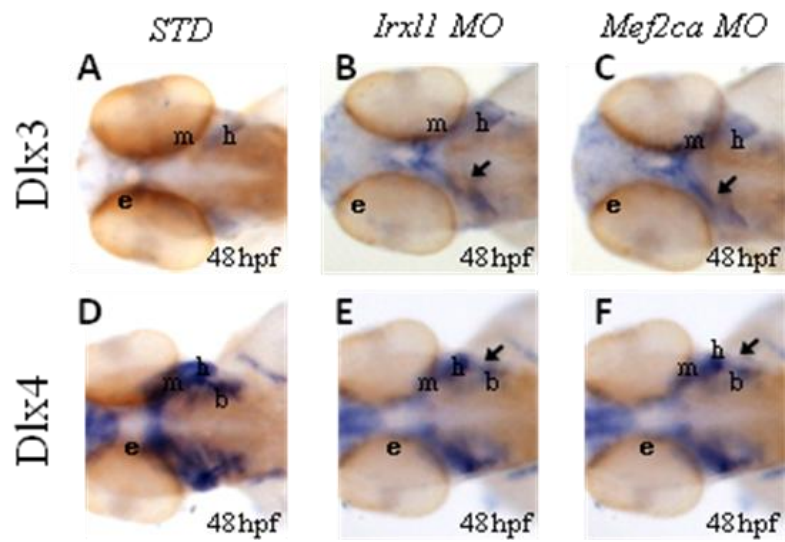
(圖二) *Mef2ca* morphant 其下顎軟骨發育不全。將顯微注射 *Mef2ca*-MO 的胚胎，再利用軟骨染色實驗觀察第一隊及第二對軟骨缺失情形(B-D)。cb, ceratobranchials; ch, ceratohyal; hys, hyosymplectic; m, Meckel's cartilage; pq, palatoquadrate.



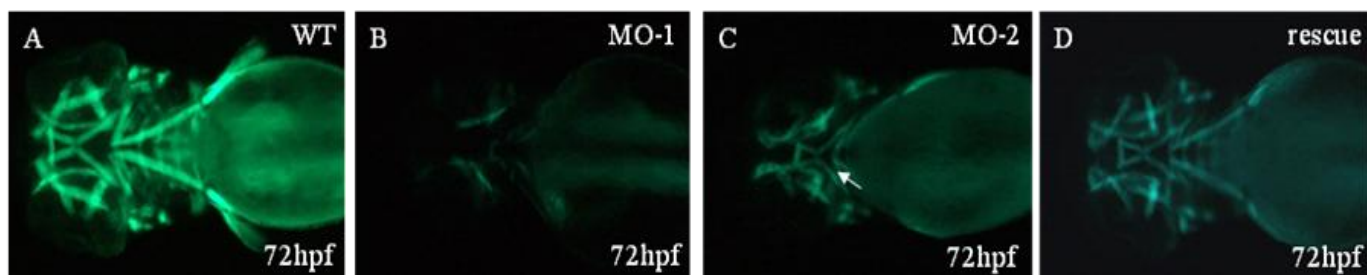
(圖三) 偵測*Irx11*以及*Mef2ca* morphant在早期神經嵴細胞的表現量。利用全胚體原位雜交法觀察到，在24hpf表現的*Sox9b*(A-F)以及18hpf表現的*Snail2*(G-I)都可以觀察出缺少內生性*Irx11*和*Mef2ca*的胚胎對於神經嵴細胞表現量都會有下降的表現情形。e,eye.
nc, nueral crest cell. ov, otic vesicle.



(圖四) 偵測*Irx11*以及*Mef2ca* morphant在神經嵴遷移至軟骨之細胞以及咽喉腮弓發育形成的表現量。利用全胚體原位雜交法觀察到，在30hpf表現的*Dlx2* (A-F)與48hpf表現的*Sox9a* (G-L)都可以觀察出缺少內生性*Irx11*和*Mef2ca*的胚胎對於咽喉腮弓發育形成表現都有抑制的現象。
di,diencephalon. h, hyoid m, mandibular. te, telencephalon. b, branchia.



(圖五) 偵測 *Irx11* 以及 *Mef2ca* morphant 在 48hpf *Dlx3* 與 *Dlx4* 的表現量。文獻指出 *Mef2ca* 會去抑制 *Dlx3* 的表現，但對 *Dlx4* 表現卻是促進的作用。在全胚胎原位雜交法發現顯微注射 *Mef2ca*-MO 和 *Irx11*-MO 的胚胎對於 *Dlx3* 表現量比起 STD 的胚胎較多 (A-C)，而 *Dlx4* 在 morphant 有被抑制的現象 (D-F)。

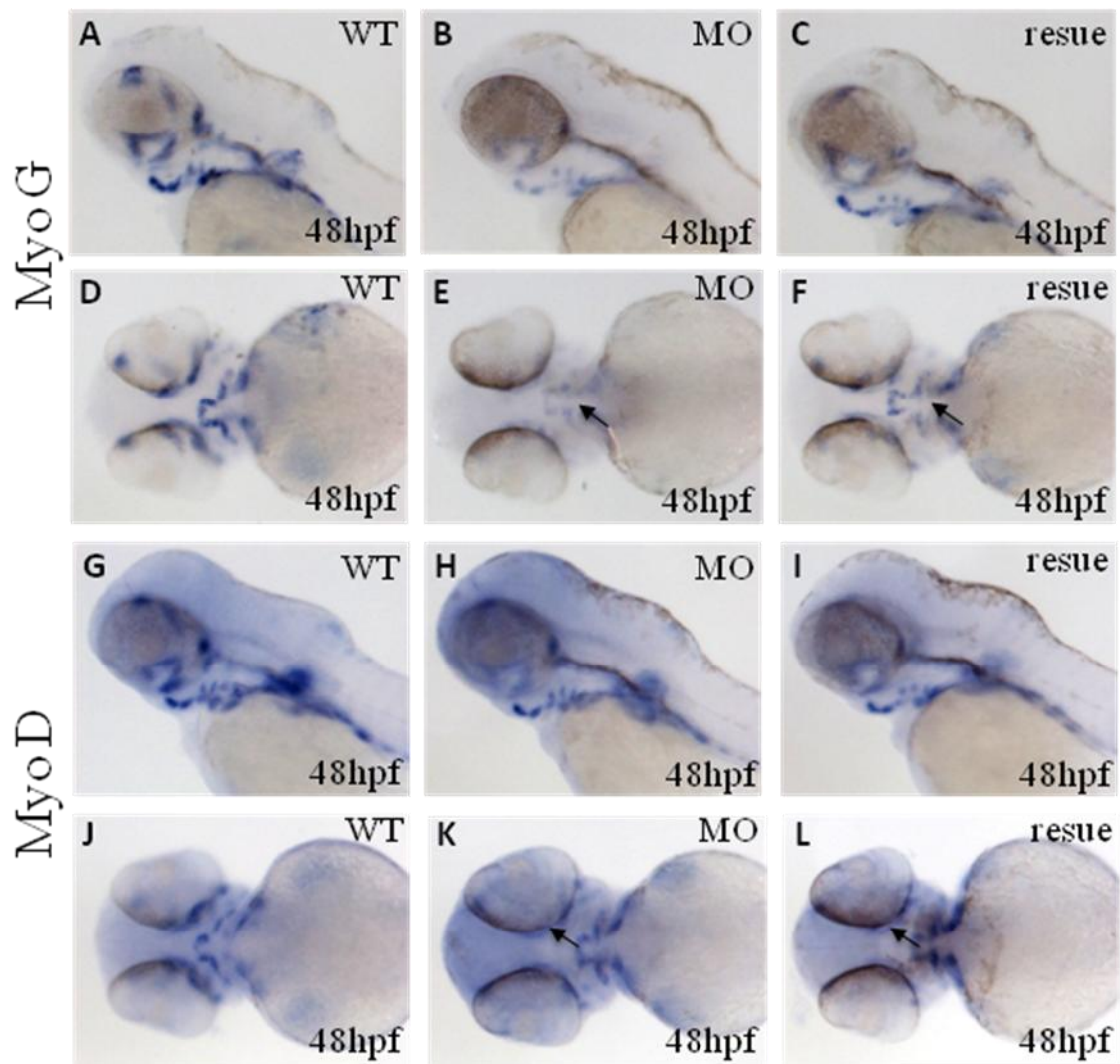


E.

	<i>WT</i>	<i>Mef2ca</i> MO	<i>Mef2ca</i> + <i>Irx11a</i> cRNA rescue
normal	100% (26/26)	61.36% (27/44)	85.45% (47/55)
EGFP decrease	0% (0/26)	31.81% (14/44)	10.9% (6/55)
mutant	0% (0/26)	6.81% (3/44)	3.64% (2/55)

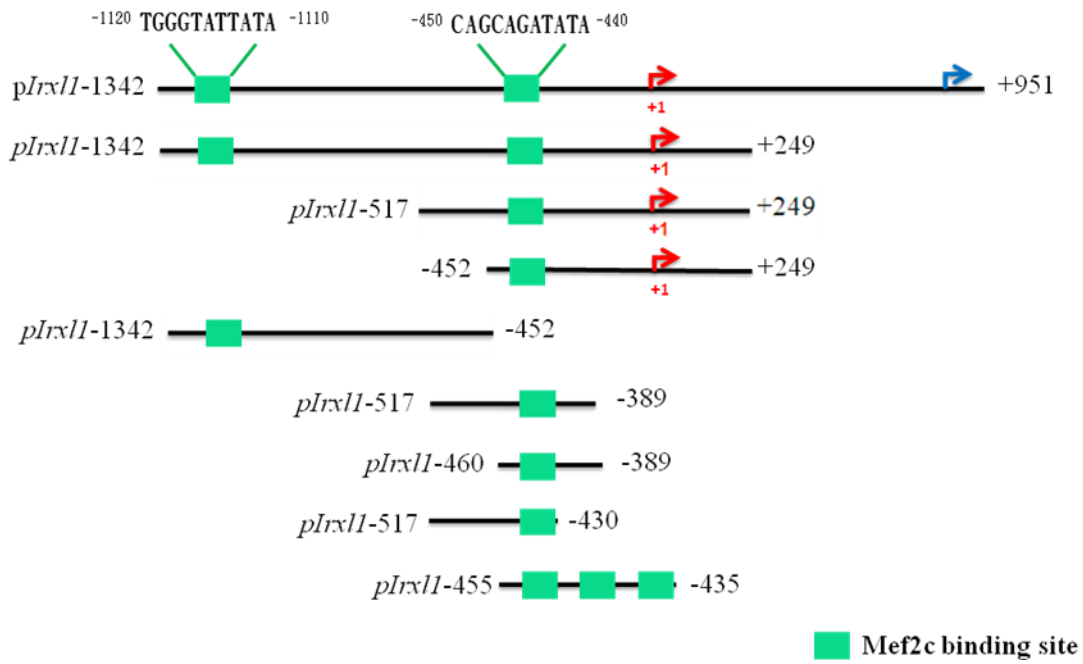
(圖六) 利用肌肉發螢光的轉殖基因魚MLC (TgMLC:EGFP+/-)(A)來證明

Mef2ca morphant 可以被 *Irx11a* 回復。單獨注射 *Mef2ca*-MO 會導致肌肉發育缺陷(B-C)，如果將 800 pg/per embryo *Irx11a* cRNA 一起注射 72hpf 胚胎內會發現 800 pg/per embryo *Irx11a* cRNA 會使 72hpf *Mef2ca* Morphant 造成肌肉缺失的情形恢復(D)。

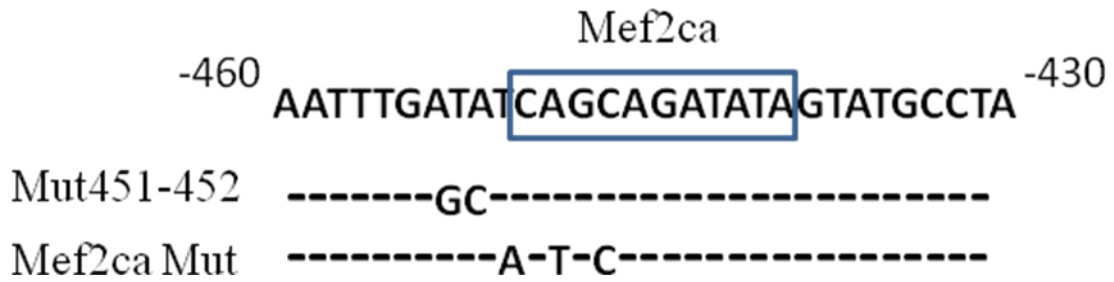


(圖七) 我們利用 *MyoG* 與 *MyoD* 作為肌肉 marker，觀察 *Mef2ca* morphant 加入 800 pg/per embryo *Irx11a* cRNA 是否有恢復作用。結果發現在 48hpf *Mef2ca* Morphant 其 *MyoG* 表現量因為 *Irx11a* cRNA 的加入而有恢復作用 (C,F)，但 *MyoD* 卻無明顯現象 (I,L)。

A.

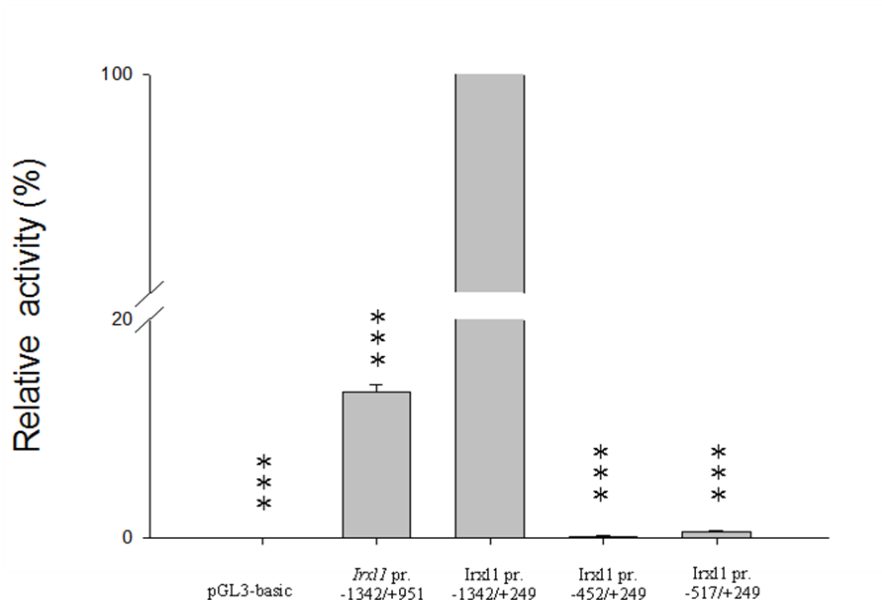


B

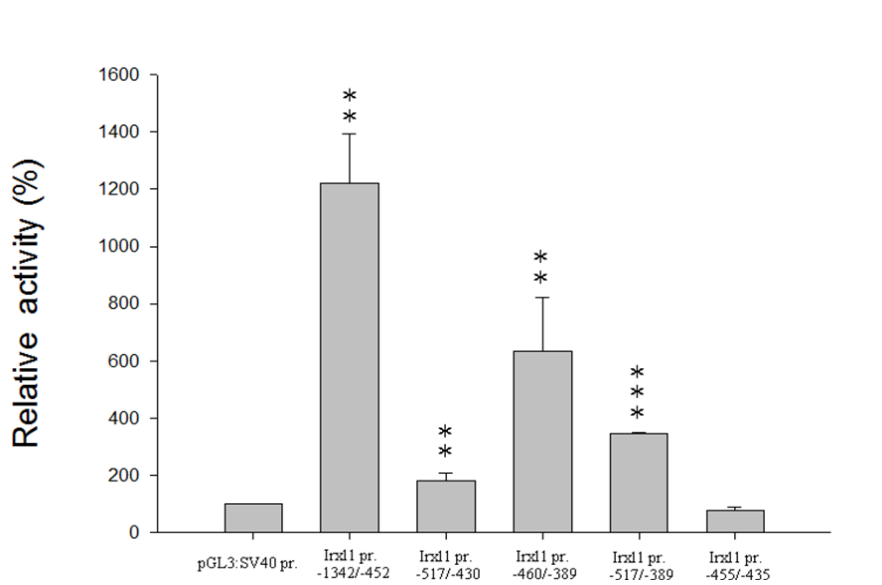


(圖八) Dual-luciferase reporter assay 所用之所有 *Irx11* pr. (A) 以及點突變的片段 (B)。將本實驗所有 *Irx11* pr. 片段利用生資網站分析其調控因子 Mef2c 結合位置，分別在序列上 -1120/-1110 和 -450/-440。

A.

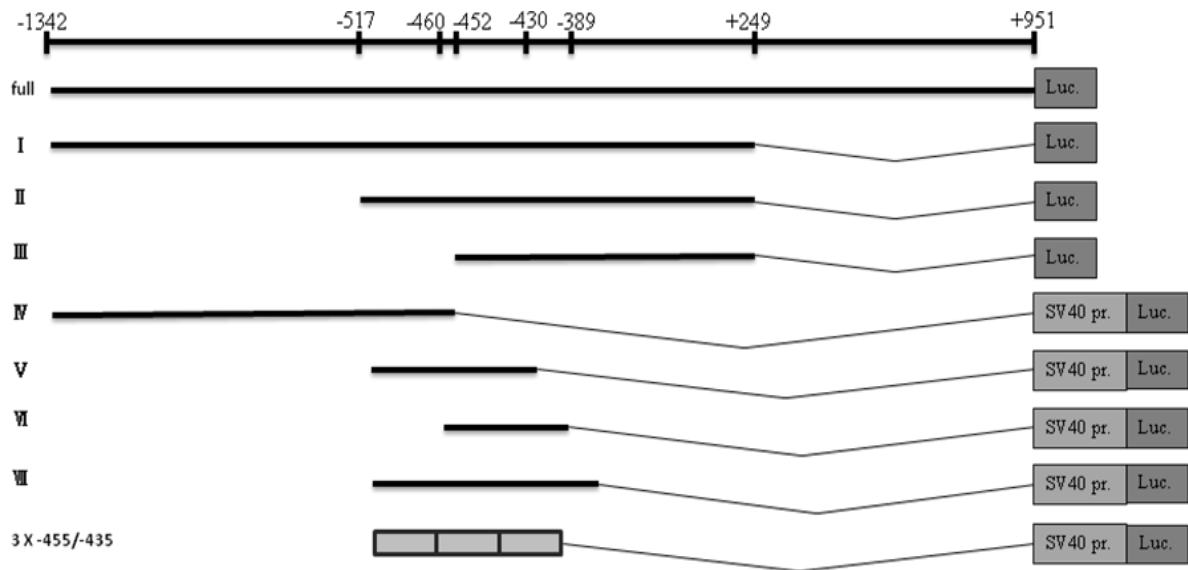


B.

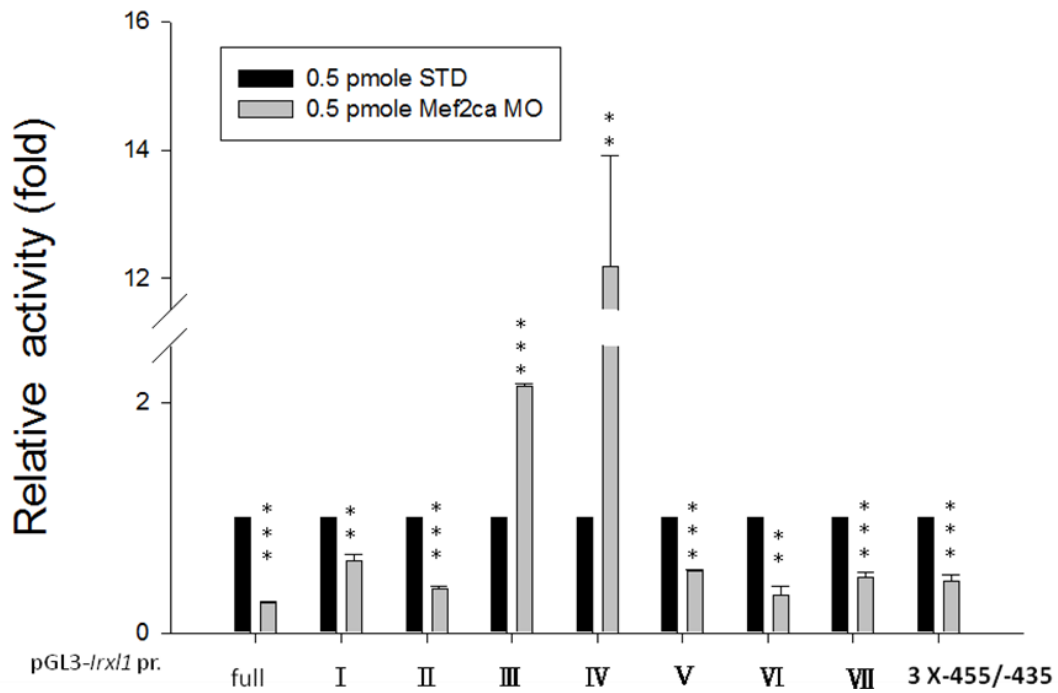


(圖九) 雙冷光素酶活性分析法分析 *Irx11* pr. 活性。將選殖帶有不同片段的 Mef2c binding site 的 *Irx11* pr. 注射至胚胎，於 48hpf 收下並偵測雙螢光素酶的活性，觀察不同長度 *Irx11* pr. 的活性。以活性最高的 *Irx11* pr. -1342/+249 當基準，比較其他 *Irx11* pr. 活性(A)。顯示 *Irx11* pr. -1342/-452 的活性(B)。**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$

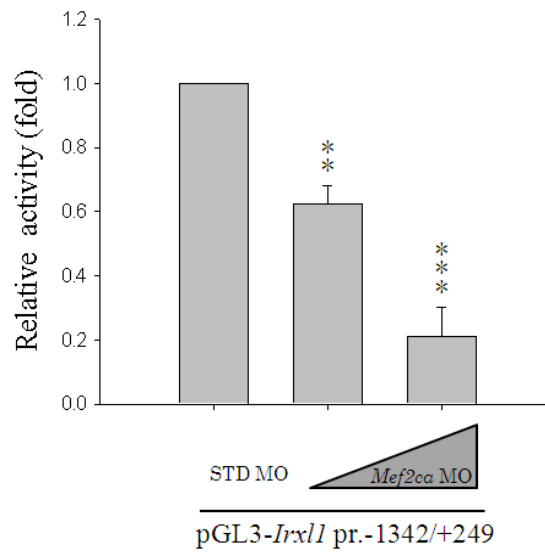
A.



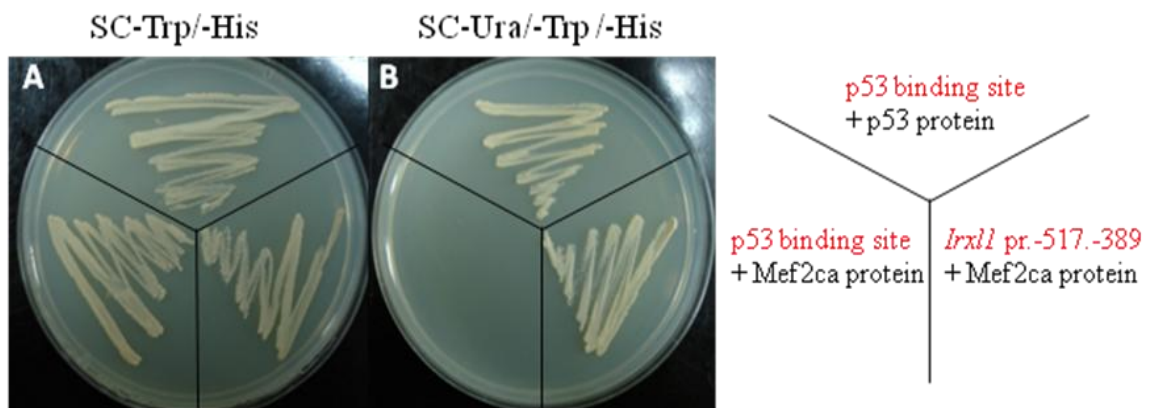
B.



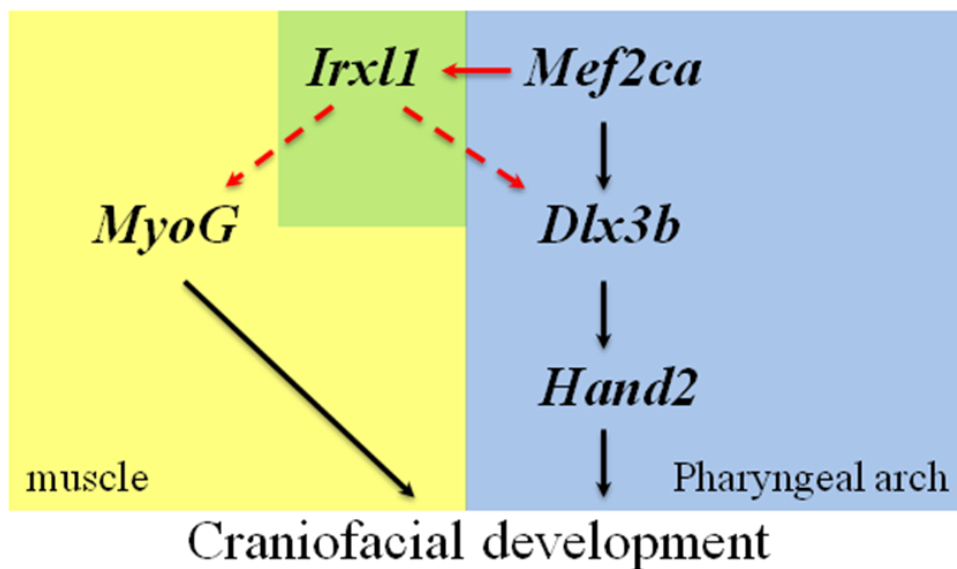
C.



(圖十) 雙冷光素酶活性分析法證明Mef2ca調控Irx11 pr.。將不同片段的Irx11 pr. (A)與Mef2ca-MO一起注射至胚胎，觀察Irx11與Mef2ca之間的調控關係。顯示出Irx11 pr.和Mef2ca調控關係主要為正調控現象，但如果選殖出來的Irx11 pr.-452左右的區域被截斷就會形成負調控的趨勢(B)，因此猜測Irx11與Mef2ca之間直接結合調控的區域可能在附近。Mef2ca-MO會調控Irx11 pr.-1342/+249使得pr.活性降低，也發現抑制的調控有dose dependent 的現象(C)。**表示P<0.01，***表示P<0.001



(圖十一) 利用酵母菌單雜合法可分析出蛋白Mef2ca會和 *Irx11* pr. -517/-389 結合，(A)p53 protein, Mef2ca protein (Black), p53 binding site, *Irx11* pr.-517.-389 (Red)兩者有 matting。接著活化下游的報導基因使得酵母菌可以存活在 SC-Ura/-Trp/-His 的培養盤上(B)，證明Mef2ca 與 *Irx11* pr. -517/-389有直接的調控關係。

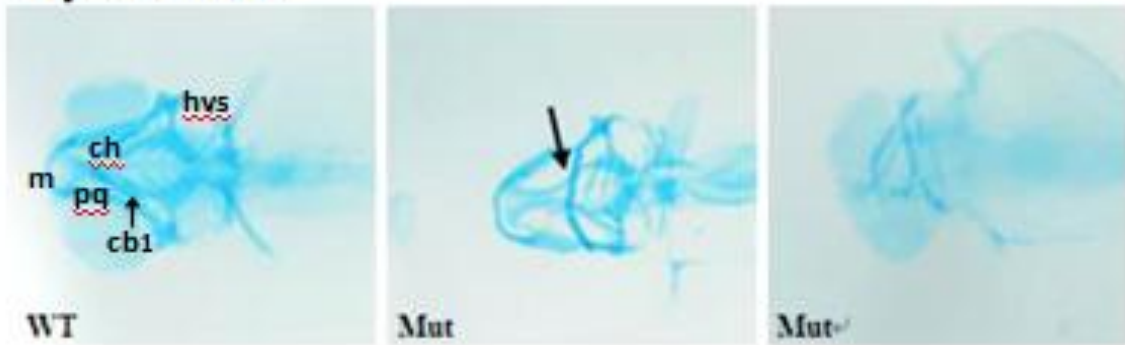


(圖十二) 預測 *Irx11* 影響顱面發育的途徑。

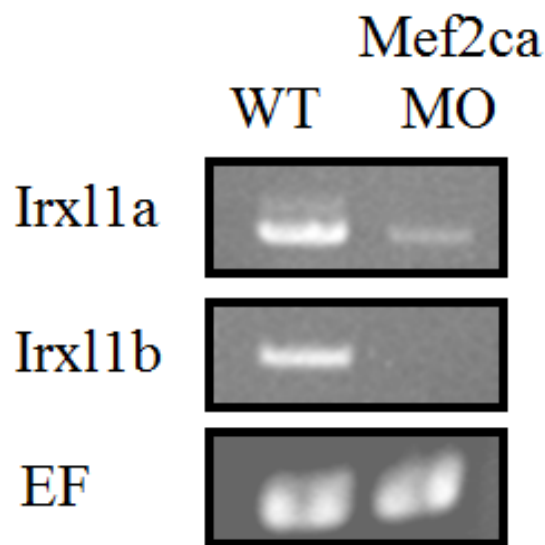
表一、利用軟骨染色法觀察*Mef2ca morphant*無法利用*Irx11a* cRNA回復的統計數值。

	<i>Mef2ca</i> MO	<i>Mef2ca</i> + <i>Irx11a</i> cRNA rescue
WT	58.33% (3/144)	56.25% (54/96)
mandibular mutant	2.08% (57/144)	4.17% (4/96)
Hyoid mutant	39.58% (84/144)	39.58% (38/96)

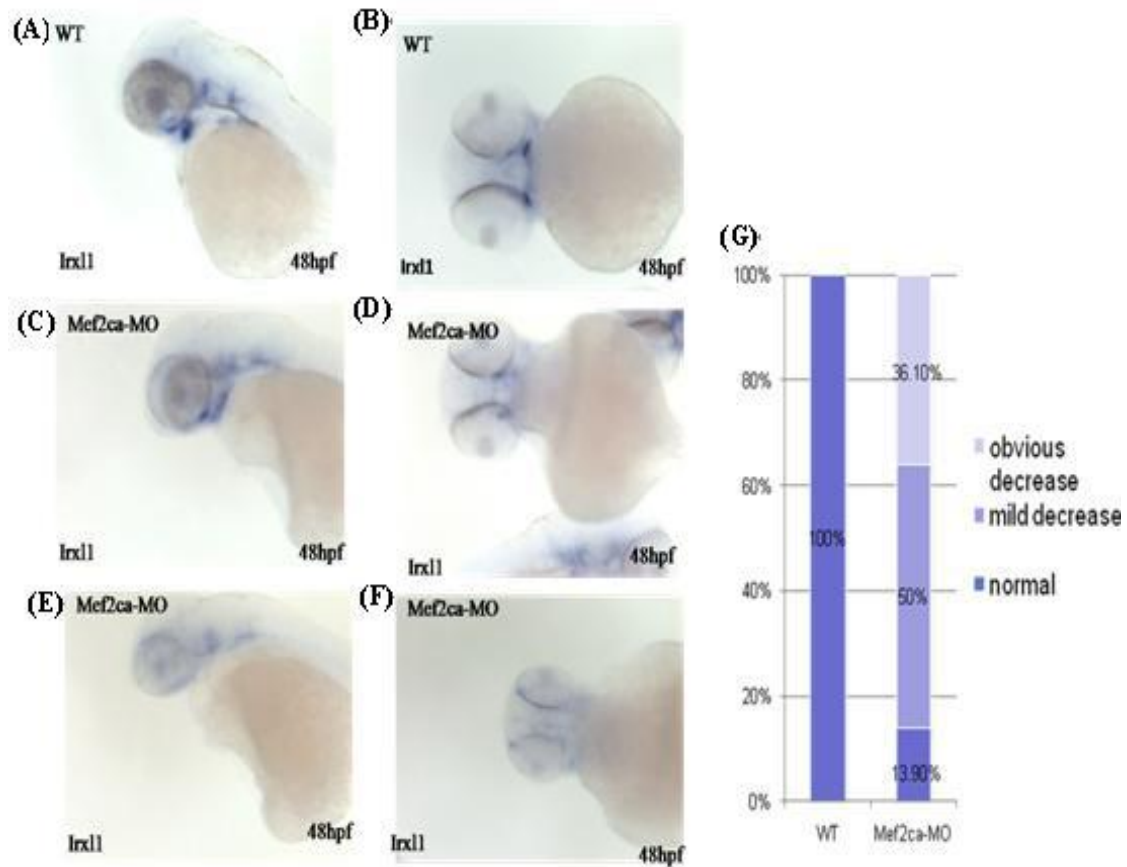
Mef2ca mutant



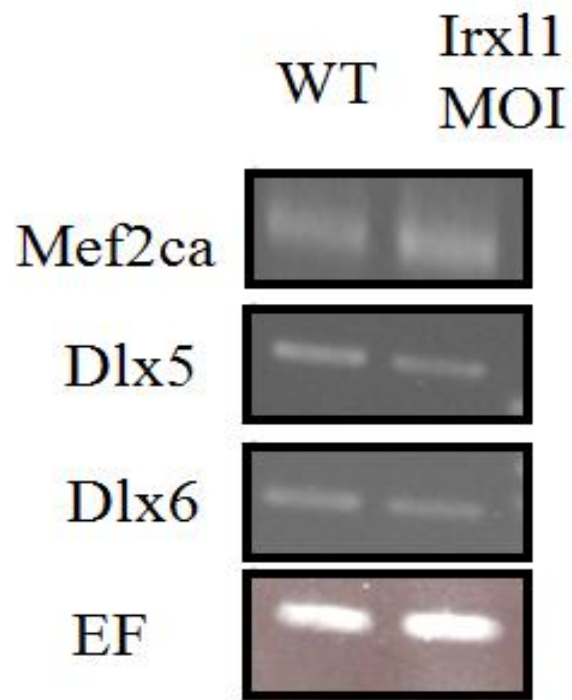
附圖 (一) *Mef2ca*^{tn213/tn213} 下顎軟骨發育不全。*Mef2ca*^{tn213/tn213} 用軟骨染色實驗觀察到咽喉鰓弓軟骨組織於胚胎120hpf觀察到兩種嚴重畸形。



附圖 (二) 利用PT-PCR顯示在*Mef2ca* Morphants裡*Irxl1a*與*Irxl1b*表現量下降。顯示*Mef2ca*在*Irxl1*的上游(From Han-Ni Chuang)。



附圖 (三) *Mef2ca* Morphants 裡 *Irx11* 的表現量下降。在野生型48hpf的胚胎 *Irx11* 主要表現在咽喉腮弓的位置(A、B)，當 *Mef2ca* knock down 後 *Irx11* 的表現量會跟著下降(C、D)，嚴重的Morphants甚至不表現 *Irx11* mRNA(E、F)。這些特徵統計圖(G)，*Irx11* 表現量下降的占50%，完全不表現的占36.1% (From Han-Ni Chuang)。



附圖 (四) 利用RT-PCR顯示 *Irx11* morphants 不會去影響 *Mef2ca* 以及它的下游 *Dlx5/6* 的表現象，證明 *Irx11* 沒有參與此途徑 (From Han-Ni Chuang)。

。

Reference

- Mukherjee K, Burglin TR.** (2007) Comprehensive Analysis of Animal TALE Homeobox Genes: New Conserved Motifs and Cases of Accelerated Evolution *J Mol Evol* 65:137–153,.
- Lecaudey V, Anselme I, Dildrop R, Ruther U, Schneider-Maunoury S** (2005) Expression of the Zebrafish Iroquois Genes during Early Nervous System Formation and Patterning. *The Journal of Comparative Neurology* 492: 289–302,.
- Takeuchi JK., Bruneau BG.** (2007) *Irx11*, a divergent Iroquois homeobox family transcription factor gene. *Gene Expression Patterns* 7: 51–56,
- Anderson D M., Arredondo J, Hahn K, Valente G, Martin JF., Wilson-Rawls J, and Rawls A.** (2006) Mohawk Is a Novel Homeobox Gene Expressed in the Developing Mouse Embryo. *Developmental Dynamics* 235:792–801,
- Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H.** (2010) The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*;107(23):10538-42.
- Chuang HN, Cheng HY, Hsiao KM, Lin CW, Lin ML, Pan H.** (2010) The zebrafish homeobox gene *irx11* is required for brain and pharyngeal arch morphogenesis. *Dev Dyn*.239(2):639-50
- Cheng HY, Panzz H** (2007) Identification, Expression and Functional Analysis of a Novel Homeobox Gene, *Irx11*, in Zebrafish Embryonic Development: Master Thesis, Institute of Medicine, Chung Shan Medical University,.
- Verzi MP., Agarwal P, Brown C, McCulley DJ., Schwarz JJ., and Black BL.** (2007) The Transcription Factor MEF2C Is Required for Craniofacial Development. *Developmental Cell* 12: 645–652,
- Miller CT., Swartz ME., Khuu PA., Walker MB., Eberhart JK., Kimmel CB.** (2007) *Mef2ca* is required in cranial neural crest to effect Endothelin1 signaling in zebrafish. *Developmental Biology* 308: 144–157,
- Trainor PA.** (2005) Specification of neuralcrest cell formation and migration in mouse embryos. *Semin Cell Dev Biol*16:683–693.
- Anderson DM., Brian J. Beres, Wilson-Rawls J.,and Rawls1 A.** (2009) The Homeobox Gene Mohawk Represses Transcription by Recruiting the Sin3A/HDACCo-repressor Complex. *Developmental dynamics* 238:572–580