

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 以酵母菌單雜合法研究斑馬魚 lrx11 上游及下游基因 *
* 名稱 的調控機制 *
* ***** *

執行計畫學生： 曾鈺純
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-021-B
研究期間： 98年07月01日至99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 99年03月31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
* : 以酵母菌單雜合法研究斑馬魚 Irx11 上游及下游基因的調控機制 *
名稱

執行計畫學生：曾鈺純

學生計畫編號：NSC98-2815-C-040 -021 -B

研究期間：98年7月1日至 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：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國

99年

3月

30日

目錄

摘要.....	P 2
序論.....	P 3
材料與方法	P 7
結果	P 10
討論.....	P 15
圖.....	P 17
附圖表	P 29
參考文獻	P 32

摘要

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。由於目前只有發表小鼠*Irx11*基因的序列與表現，其對胚胎發育的調控機制仍無研究，在其他物種中也無相關文獻，因此先前實驗室利用斑馬魚來探討*Irx11*在胚胎發育上所扮演的角色。斑馬魚的*Irx11*主要表現在胚胎的位置為咽喉鰓弓，而在成體組織則廣泛表現於腦、眼睛、肌肉、卵巢、睪丸與鰓。*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。由於*Irx11*序列上游有人類Mef2的結合位置，且文獻指出，小鼠及斑馬魚的Mef2c與咽喉鰓弓及下顎軟骨發育有關，所以利用全胚胎原位雜交，在Mef2ca的斑馬魚突變種以及Mef2ca morphants的胚胎中偵測*Irx11*，發現*Irx11*的表現量皆有下降，顯示Mef2ca可能是*Irx11*的上游調控者；另一方面，*Irx11* morphants會造成眼外肌及咽弧肌部分缺失，但在體節部位則可看到*myoD*表現上升。並且從Dual-luciferase reporter分析的結果，也初步證實抑制Mef2ca會影響*Irx11* promoter的活性；而*Irx11*則會抑制*myoD* promoter的活性。因此推測*Irx11*可能受Mef2ca調控以及參與*myoD*對肌肉特化的調控途徑。在本計畫中，除了利用Dual-luciferase reporter將*Irx11* promoter的cis-element進一步縮小為-172/+951，也藉由yeast one hybrid的方法，利用蛋白質與選殖基因promoter序列的結合，activation domain會啟動下游reporter基因的活化，來證實*Irx11* promoter與Mef2ca以及*Irx11*與*myoD* promoter之間的關係是否經由直接結合而調控。再進一步利用電泳遷移率檢測法(EMSA)來檢測標記的promoter序列探針是否能與蛋白結合，而有gel-shift的現象，並設計突變點以確認binding site的位置。

序論

Homeobox gene的共同特徵為含有homeodomain，此區域由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，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：若有不正常的調控則會導致神經母細胞瘤、Currarino syndrome、血癌、惡性腫瘤等疾病(1)。

含有homeodomain的蛋白質為一龐大的蛋白家族，且依序列相似度可再細分為次家族。其中TALE (three-amino acid-loop extension)，為非典型的homeodomain家族，其第一與第二個螺旋間所形成的loop區域較典型的序列多出三個胺基酸(Proline-Tyrosine-Proline)。有些TALE homeodomain蛋白是HOX cluster的重要輔因子，決定了體軸的前後(1)。依照其結構的特徵，此次家族又可分為PBC、MEIS、IRO(Iroquois)、TGIF、及最近的歸納出的MKX幾大類。MKX與IRO最為相近，但是不含有IRO box，其特徵為homeodomain下游有3個motif，分別為MKX A、MKX B、MKX C。MKX A是homeodomain C端的延伸，大約有30個胺基酸，MKX B、C則是位於更下游，分別為15和12個胺基酸長，而MKX B含豐富的疏水性胺基酸，極可能為蛋白與蛋白間交互作用的區域，經由序列比對發現，MKX在人類、老鼠、爪蟾和雞均有一基因，而在斑馬魚中則有2個(3)。在老鼠的胚胎發育中，MKX表現在體節的premyogenic cell、中軸骨的prechondrogenic mesenchymal cells、側肢與尾巴的pretendenous cells、後腎小管、雄性性腺等部位的發育(2)。

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(2)。在哺乳類動物有 6 個基因，可分為兩個聚集：*IrxA (Irx1、Irx2、Irx4)*、*IrxB (Irx3、Irx5、Irx6)*；在斑馬魚中則有 11 個，分為 *IrxAa (Irx1a、Irx2a、Irx4a)*、*IrxAb (Irx1b、Irx4b)*、*IrxBa (Irx3a、Irx5a、Irx6a)*、*IrxBb (Irx3b、Irx5b)* 四個聚集以及 *Irx7*，且在其他的脊椎動物也有 *Irx* 基因的發現。*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(4)。而 *Irx* 家族分別在不同時間與空間調控頭部區域：如中腦、後腦、小腦及耳石、脊索、界線及 rhombomeres 的形成、以及體節尾端等(4)。

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)* (5)，在其他文獻中則命名為 *Mkx* (2)。*Irx11* 在斑馬魚、和河豚、青蛙、老鼠中具有同源關係。*Irx11/Mkx* 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 myoblast、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脊索周圍的間葉細胞。由全胚體原位雜交來看，可以發現 *Irx11/Mkx* 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/Mkx* 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。這些觀察暗示 *Irx11/Mkx* 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/Mkx* 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/Mkx* 極有可能是 *Tw* 的候選基因(5)。

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。經由RACE-PCR選殖出完整的基因序列，並發現有兩種isoform，分別命名為 *Irx11a*、*Irx11b*。*Irx11a* 由7個exon組成，長度為2945bp，可轉譯出349個胺基酸；*Irx11b*則含5個exon，長度為1934bp，可轉譯出308個胺基酸，與 *Irx11a* 的差別只在於蛋白質C端序列的不同。胺基酸比對發現，*Irx11* 在 exon 3、exon 4 含有 homeodomain，與 *Irx* genes 最為相近，但是沒有 IRO box。利用 RT-PCR 得知，*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：腦、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，而體軸的部分利用 RT-PCR 觀察到有表現。利用 morpholino knock down *Irx11* 後的胚胎，會造成腦部型態發育異常，以及咽喉鰓弓、中胚層與軟骨組織型態發育異常，且由 *flh*、*dlx2*、*wnt1*、*krox20*、*pax2.1*、*nkx2.3*、*myoD*、*sox9a* 等基因的表現直接或間接的受到 *Irx11* 的調控。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。Alcian blue 染色結果顯示下顎軟骨組織嚴重缺陷，此情況與小鼠的 *Twirler* mutation 顎裂之外表型(5)非常相似，顯示 *Irx11* 基因可能會參與下顎形態發育(6)。利用預測調控區的網站 Berkeley Drosophila Genome Project 把斑馬魚上游2Kb之序列進行分析，結果發現有四個序列保留的區域。

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，已知老鼠的 *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* (7)。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，其下游基因有 *hand2*、*bapx1*、*gsc*、*dlx* genes。比較魚與老鼠 *Mef2c* 的表現位置相似、下游也有類似的基因(8)。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 *Mef2c* 會調控 *Dlx* genes，且在表現時期上，*Mef2c* 從 16~19 小時開始表現，且 knockdown 後，咽喉鰓弓的軟骨異常情形與 *Irx11* morphant 極為相似。另外，將得到的 consensus sequence 分別輸入 ConSite 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和時間，找出與 *Irx11* 最相關的轉錄調控因子，初步我們發現了 *Pax2*, *Mef2*, *sox9a* 及 *Gata2* 等因子可能參與其中，因此我們推測 *Irx11* 可能參與 *Mef2c* 對咽喉鰓弓軟骨發育的調控途徑。藉由全胚胎原位雜交，*Irx11* 的表現在 *Mef2ca* 的斑馬魚突變種以及 morpholino-knockdown 的胚胎中皆有下降。而在 Dual-luciferase assay 的實驗中，當加入 *Mef2ca* 時，*Irx11* promoter 被活化；而加入 *Mef2ca* MO 時，*Irx11* promoter 被抑制，於是我們初步認為 *Mef2ca* 可調控 *Irx11* promoter 的表現。

MyoD 是一個調節脊椎動物肌肉分化有關的基因，屬於 muscle regulatory factors (MRF) 的肌肉調節轉錄因子群的一員。這群特異性的轉錄因子都具有 basic-helix-loop-helix (bHLH) domain。藉著此 domain 與細胞內之其他的轉錄因子如 E12 或 E47 等形成異雙體 (heterodimer)，再與基因上游啟動子區域之 E-box (CANNTG) 結合，進而活化專一性表現在肌肉的基因，所以常被用來作為早期肌肉分化的 marker(9,10)。而在斑馬魚胚胎 segmentation 時期，*myoD* 會沿著體軸表現在新生成的體節部分，直至尾端體節形成後，才慢慢表現在其他肌肉組織。有文獻指出對於在小鼠纖維母細胞(10T1/2)被 *myoD* 驅動轉化為肌肉細胞的過程中，*Irx11* 可扮演抑制者的角色(11)。且在注射 morpholino-knockdown 的 *Irx11* 胚胎中，體軸部分 *myoD* 基因表現量上升。因此我們想要了解在斑馬魚身上 *Irx11* 是否有參與 *myoD* 對肌肉特化的調控徑。利用 Dual-luciferase reporter assay，初步判斷 *Irx11* 會抑制 *myoD* promoter 的活性。本計畫的目的在探討 *Mef2ca* 是否直接結合在特定的 *Irx11* promoter 區域，及 *Irx11* 是否直接與 *myoD* promoter 有結合，並找出 *Irx11* 基因的調節區域。

材料與方法

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. Dual-luciferase reporter assay

收集24 hpf或48hpf的胚胎20顆，加入100µl 1X passive lysis buffer (Promega)，用研磨棒將胚胎磨碎，放置室溫靜置15分鐘，使胚胎溶解完全。4°C離心、12000rpm、15分鐘，取上清液至新的離心管。取10µl樣本至於96 well，放置冷光測定儀(Applied Biosystems)中，加入LARII 50µl(Promega)與樣本反應，測定firefly luciferase。再加入1X Stop & Glow Reagent (Promega)，測定Renilla luciferases，校正實驗上的誤差。

公式如下：

$$\left(\frac{\text{實驗組 firefly luciferase}}{\text{實驗組 Renilla luciferase}} \right) \div \left(\frac{\text{對照組 firefly luciferase}}{\text{對照組 Renilla luciferase}} \right) \times 100\% = \%$$

3. 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(W303α 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，待其單一菌落長出。接著挑出單一菌落種於含有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* promoter 以及*Irx11*對 *myoD* promoter的調控

先建立*myoD* promoter與*Irx11* promoter的construct到帶有reporter gene的質體(例:pHISi)，再將切成線性的質體transform到酵母菌(W303 α strain)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:pGAD424)，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(附圖二)。

- W303 α (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).

C. 酵母菌菌落聚合酶連鎖反應(Yeast Colony PCR)

醋酸鋰酵母菌轉形實驗所長出的菌落，將進一步運用酵母菌菌落聚合酶連鎖反應來驗證是否為所要的轉形菌株。利用200 μ l的微量吸管刮取適量的菌落於30 μ l的0.1% NaOH 中(其加入的菌量足以讓澄清的液體變為白色的混濁即可)，混合均勻後，以95°C十五分鐘加熱處理，使其細胞破裂，然後稍微快速離心，讓細胞殘骸離下，接著將上清液(即DNA的所在)吸取至新的離心管中，作為-20°C保存和酵母菌菌落聚合酶連鎖反應。由於NaOH會影響聚合酶連鎖反應，所以在進行酵母菌聚合酶連鎖反應時，不宜加入太多經NaOH處理所釋出的crude DNA，每25 μ l的聚合酶連鎖反應，至多加入2 μ l的crude DNA，以此方法來驗證轉形的酵母菌菌株是否為本研究所要的。

結果

一、 Mef2ca 與 *Irx11* promoter 之調控關係

A. 利用測定冷光看 Mef2ca 對 *Irx11* promoter 是否有影響

先前實驗室已利用 Dual-Luciferase reporter assay，結果證實 Mef2ca 對 *Irx11* promoter-1342/+951 有促進之調控，且再利用生物資訊的方法在 BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) 網站上的 NNPP (Neural Network Promoter Prediction) 系統，分析 *Irx11* promoter 的序列，發現 *Irx11* promoter 上面有 4 個可能為真核生物的轉錄因子所調控的區域。將 BDGP 網站上所分析的序列再放至 Consite 網站去分析，發現 *Irx11* promoter 上有四個 motif，為數個轉錄因子所結合的位置，其中兩個是人類 Mef2 的結合位置，分別為 -1198/-1022、+606/+724。於是我進一步將 *Irx11* promoter 縮短為 -172/+951 (不包含 motif1)、+79/+951 (不包含 motif1、2)、-1198/-1022 (motif1)、+606/+724 (motif4)，接入 pGEM-T easy 質體後，再以酵素切處理後接進 pGL3-basic 質體。pGL3 basic 含有 firefly luciferase，因此將 *Irx11* promoter 接進 pGL3 basic，而 pRL 含有 Renilla luciferase 以及 TK promoter，同時將兩種質體注射至 1~2 個細胞的胚胎細胞中，以 pGL3 basic + pRL 當 negative control，收下 24 小時的胚胎測定冷光表現量，由量化統計圖來看，可以確定我們選殖的此段 *Irx11* promoter -172/+951 具有活性，接著同時注射 pCS2⁺-Mef2ca，與同時注射 pCS2⁺做對照，收 24 小時的胚胎測定冷光，結果顯示 *Irx11* promoter 的活性上升，由此結果確定 Mef2ca 可促進 *Irx11* promoter-172/+951 的表現；而在 *Irx11* promoter +79/+951 及 -1198/-1022 的結果顯示加入 Mef2ca 使 *Irx11* promoter 的活性下降，在 *Irx11* promoter +606/+724 的區域已沒有活性(圖一)。

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

目前實驗室推測 Mef2ca 會促進 *Irx11* promoter -1342/+951，所以我將利用 Yeast one hybrid 進一步探討兩者是否為直接結合而互相調控。首先將 *Irx11* 的序列-1342/+951，接入 pGEM-T easy 質體，以 EcoR I 酵素切接入 pHISi 質體中(圖二)。pHISi 載體上的 his3 基因(在此基因的中間位置有單一個 xho I 限制酶切點)，以 xho I 限制酶處理切成線狀(~8.9 kb)，再將此片段進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗，則此片段將會置入酵母菌染色體上 his3 locus 上(圖三)。

在 *Irx11* promoter 的部分，經 BDGP 網站分析，預測 cis-element，將 *Irx11* promoter 縮短為-172/+951，同樣接進 pHISi 後(圖四、五)，以 Apa I 限制酶切開，經轉形作用接入 ura3 locus 上。而 pHISi 含有 Ura3 基因表現出 uracil，利用缺乏 uracil 的培養基篩選出成功 integrate 的菌株。但是 pHISi 質體上含有 minimal promoter，會產生 leaky Histidine 的表現，所以若以此為 reporter gene 時，須先抑制質體上 Histidine 的表現。利用一種 HIS3 基因的競爭性抑制劑，3-Amino-1,2,4-triazole(3-AT)，主要抑制在催化 histidine 生成步驟中的第六步酵素 Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase。於是我利用不同濃度的 3-AT，以及稀釋成不同數目的酵母菌細胞數，找出最適當的 3-AT 濃度已進行抑制。將已成功 integrate 到酵母菌染色體中的 strain，經液態培養基培養至 OD₆₀₀ 之值到達 0.6 後，分別將細胞數稀釋為 10⁵、10⁴、10³、10² 顆，滴在含有 0、20、40、60、80mM 之 3-AT 的 uracil、histidine 之營養缺陷培養基上，培養 1 至 3 天後。觀察到在培養 2 天的情況下，可以 60mM 之 3-AT 抑制掉 10³ 顆的細胞數生長，隨後實驗即以此濃度進行(Fig. 6)。

而我將 Mef2ca 全長先接入 pGEM-T easy 質體，利用 EcoRI 將此段序列

切下，接入 pGAD424 裡(圖五)，進行醋酸鋰酵母菌轉形作用，分別轉型進入 pHISi-*Irx11* promoter-1342/+951、-172/+951 的菌株。而 pGAD424 含有 Leu2 基因表現出 leucine，利用缺乏 leucine 的培養基篩選出成功送入的菌株(圖六)。利用 Yeast Colony PCR 再次確認，使用當初設計於選殖 Mef2ca 所使用到 mef2ca-5-F、mef2ca-6-R 的 primer，進行 PCR 作用，條件為(1)：94°C、5 分鐘。(2) denaturing：94°C、30 秒。(3) annealing：53°C、30 秒。(4) elongation：72°C、1 分 30 秒。重複步驟(2)~(4)，35 循環。(5) 72°C、7 分鐘，片段大小為 Mef2ca 全長 1.5Kb (圖六)。挑出成功送入的 W303α [pHISi-*Irx11* promoter -1342/+951、-172/+951 +pGAD424-Mef2ca]菌株，若兩者可直接結合，即可啟動下游 histidine 表現。結果顯示 W303α [p *Irx11* -1198/-1022 -pHISi] 及 W303α [p *Irx11*+606/+724 -pHISi]不論是否加入 Mef2ca-pGAD424，菌的生長情況將相同，所以無法直接推斷兩者有直接結合的調控。而 W303α [p *Irx11*-1342/+951 -pHISi]，在加入 Mef2ca-pGAD424 時，菌的生長情況反而較差，猜測 Mef2ca 可能也有抑制的能力結合在此區域內(圖七)。

二、 *Irx11* 與 *myoD* promoter 之調控關係

A. 利用測定冷光看 *Irx11* 對 *myoD* promoter -144/-42 是否有影響

在 2009 年文獻中研究指出小鼠的 *mx1* (*Irx11*)會與 Sin3A/HDAC 形成聚合體作為轉錄的抑制因子。在小鼠纖維母細胞 10T1/2 受 *myoD* 驅動轉化為肌肉細胞過程中 *Irx11* 可扮演抑制者的角色。在斑馬魚的系統中，*Irx11* knock down 的胚胎會出現體軸及肌肉異常，所以我們想探討在斑馬魚體內 *Irx11* 對 *myoD* 的影響為何。先前學姊藉由 Dual-Luciferase reporter assay，已將 *myoD* promoter 可能的 cis-element 縮短至 -144/-42，於是我繼續利用此系統來分析。將 *myoD* promoter -144/-42 接進 pGL3 basic 注射入斑馬魚

胚胎細胞中，同時注射pCS2⁺-Irx11，與同時注射pCS2⁺做對照，收24小時的胚胎測定冷光，結果顯示，*myoD* promoter -144/-42會被Irx11表現而抑制，由此結果我們可以更加證實*myoD* promoter的 cis-element在-144/-42區域。之後又分別設計突變點在*myoD* promoter -144/-42內的兩個E-box regio上，在E-box1內*myoD* promoter -107由A變G、-104由T變G，在E-box2內*myoD* promoter -84由A變G、-81由T變G，同樣進行Dual-Luciferase reporter assay，結果顯示與未突變相同，Irx11對*myoD*皆為抑制作用，並未看出此E-box對於*myoD* promoter活性的影響(圖八)，所以將以EMSA的方法再進一步找出確切結合的序列。

B. 利用酵母菌單雜合法測試 *myoD* promoter 與 Irx11a 是否為直接結合而調控

根據文獻以及 Dual-Luciferase reporter 系統結果，所以我將利用 Yeast one hybrid 進一步探討兩者調控關係是否為直接結合。首先將 *myoD* promoter -144/-42，利用引子上面的酵素切點 Mlu I 與 Sac I 切開後接入 pHISi 質體中。以 xho I 限制酶處理切成線狀(~8.9 kb)，再將此片段進行醋酸鋰酵母菌轉形實驗，同源性重組入酵母菌染色體上 his3 locus 上(圖九)。同樣測試 3-Amino-1,2,4-triazole(3-AT)濃度，以抑制 pHISi 質體上 minimal promoter 產生的 leaky Histidine。觀察到在培養 2 天的情況下，可以 60mM 之 3-AT 抑制掉 10³ 顆的細胞數生長(圖六)。

而將Irx11a全長先接入pGEM-T easy質體，利用BamH I、Xho I將此段序列切下，接入pGAD424裡(圖十)，進行醋酸鋰酵母菌轉形作用，利用缺乏leucine的培養基篩選出成功送入的菌株。利用Yeast Colony PCR及Western Blot再次確認以挑出成功送入的W303α [pHISi- *myoD* promoter -144/-42 +pGAD424-Irx11a] 菌株，若兩者可直接結合，即可啟動下游histidine表現，

結果發現在 W303 α [pHISi -pmyoD-144/-42 +pGAD424-Irx11a] 的菌生長情況，較 W303 α [pHISi- pmyoD-144/-42 +pGAD424] 略稍微快速，約為 2~3 倍 (圖十一)，推測兩者有直接結合的調控。

討論

先前實驗室已完成斑馬魚 *Irx11* 基因表現與功能分析。於不同時期之全胚胎原位雜交法及免疫螢光法顯示，*Irx11* RNA 以及蛋白主要表現於前面兩對咽喉鰓弓，在體軸部分也有些微的表現。

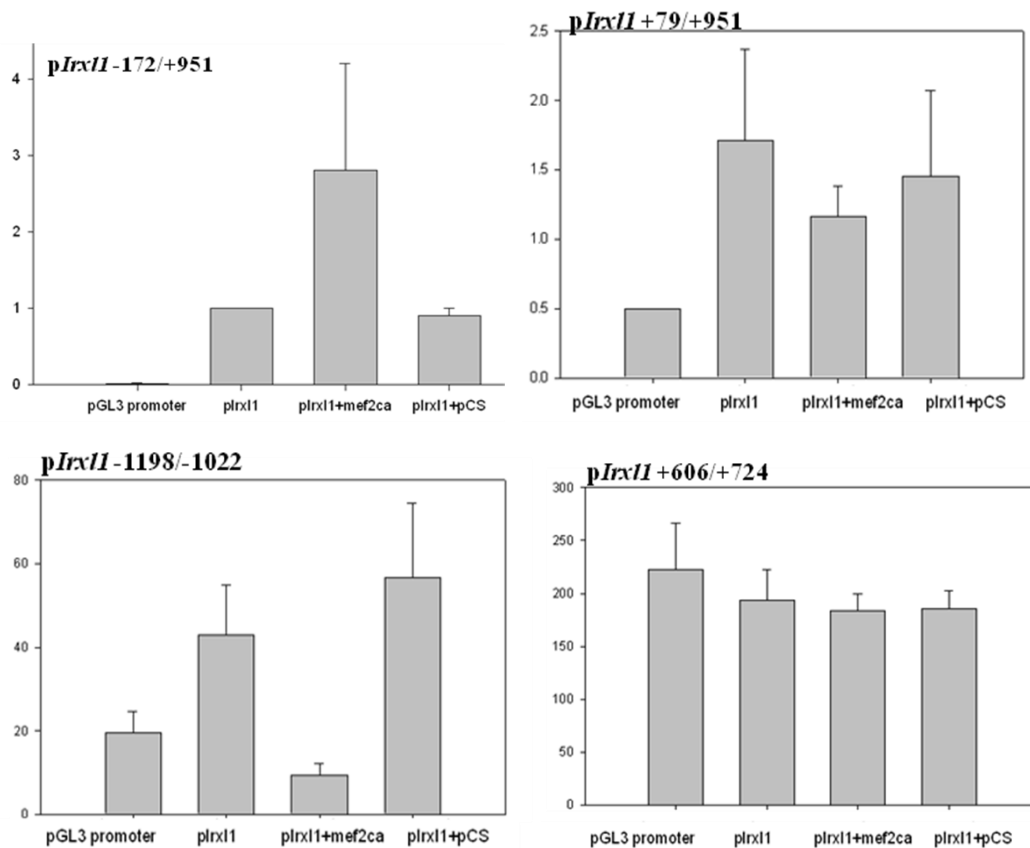
A. 探討 *Irx11* promoter 和 *Mef2ca* 之間的調控關係

利用 alcian blue 軟骨染色觀察到，以 morpholino 將 *Irx11* 基因 knock down 所造成胚胎咽喉鰓弓部位的缺陷與 *Mef2ca* mutant 頗為相似。且從 WISH 的結果，則顯示使用 mutant 的魚或是利用 morpholino 抑制 *Mef2ca* 後，在 RNA 層次，*Irx11* 表現量明顯下降。又以 Dual-Luciferase Reporter Assay 再次證明 *Mef2ca* 促進 *Irx11* 的表現。綜合以上結果可判定出 *Mef2ca* 可能為調控 *Irx11* 之上游調控因素，但 *Mef2ca* 結合在 *Irx11* promoter 的確切位置並不知道。實驗室先前已在 *Irx11* promoter 的位置 -1198/-1022、+606/+724 預測出 *Mef2ca* 可能結合調控的區域，於是我將 *Irx11* promoter -1198/-1022 deletion 後，並利用 luciferase 的實驗證明，在 *Irx11* promoter -172/+951 的序列具有 *Mef2ca* 調控的活性，但在 *Irx11* promoter -1198/-1022 及 +79/+951 反而受到 *Mef2ca* 的抑制作用。由結果推測 *Mef2ca* 可能在 *Irx11* promoter motif2 的活性上為正調控，且猜測是否也有扮演了抑制者的角色在 *Irx11* promoter 其他序列上。在 yeast one hybrid 確認兩者間是否有直接結合的調控，或是否有其他蛋白共同此調控中，將 *Irx11* promoter 做不同長度的縮短，也已將這些片段接轉型進入酵母菌中，初步結果無法推斷出兩者的直接關係。另外，在一直無法將 leaky 的菌表現量以 3-AT 抑制下來，於是猜想說是否 W303 α 菌株不適用於此系統中，將 W303 α 塗在分別缺乏 Uracil 及 Histidine 的培養基上，即使在沒有任何質體轉型進入的情況下，卻可以生長。於是我將換一個酵母菌單雜合法

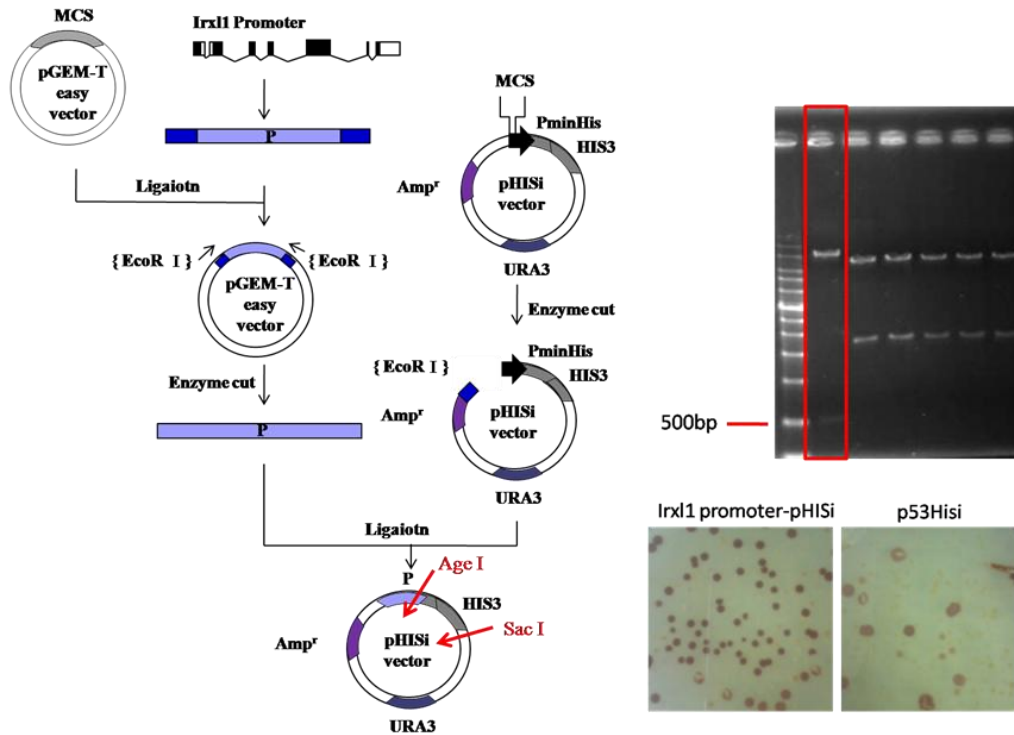
的系統，再進行此實驗(圖十二)，進一步找出Mef2ca可能調控的 cis-element。未來，將配合使用Erase-A-Base system將*Irx11* promoter作sequential deletion，利用上述方法以及EMSA更確切找出其結合位置，並確認兩者的直接關係。

B. 探討 *Irx11a* 與 *myoD* promoter 之間的調控關係

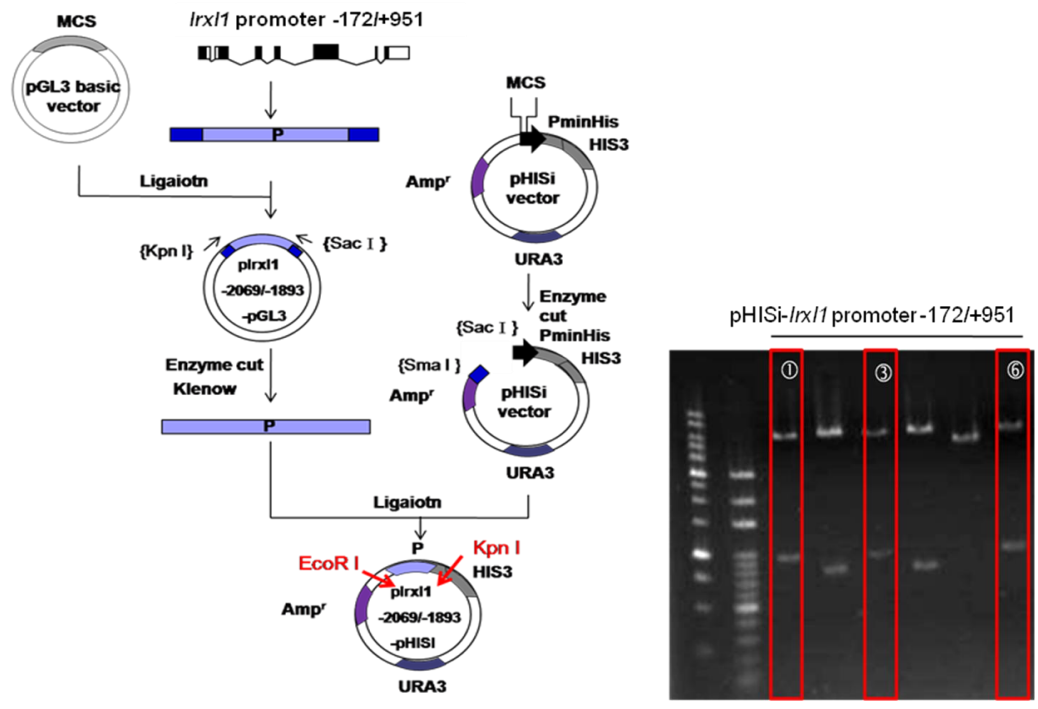
在*myoD*部分，從WISH中顯示，當利用*myoD*作為marker，在*Irx11* morphants 的胚胎中發現，體軸部分*myoD* 基因表現量上升，並不像野生型胚胎體軸的部分*myoD* 表現量已退去(圖十二、十三)，顯示*Irx11*可透過*myoD* 進而調控胚胎肌肉的發育。而在2009年的Anderson所發表的文獻指出，利用轉殖*myoD*到小鼠的纖維母細胞10T1/2 使它轉變為肌纖維細胞，然而*Irx11* 會與Sin3A/NDAC形成複合體，阻止肌肉的轉變。在Dual-Luciferase Reporter Assay中也可以發現，同時加入*Irx11a*後，firefly luciferase 表現量明顯下降，這些結果皆顯示*Irx11*可能抑制*myoD*在肌肉部分的表現。目前已縮短*myoD* promoter -144到-42，在此片段有兩個E box可結合的序列，推測*Irx11a*可能結合至此而抑制*myoD* promoter的活性，但經Dual-Luciferase Reporter Assay卻沒有看到明顯的結果。將此片段送入酵母菌中，以yeast one hybrid證實是否與*Irx11a*藉由直接結合而調控，由初步的結果認為可能有直接結合的關係。但也同樣因為W303 α 菌株不適用於此系統中，於是我將使用另一套酵母菌單雜合法的系統，再進行此實驗。同時也進行電泳遷移率檢測法 (EMSA) 進一步以確認binding site的位置。



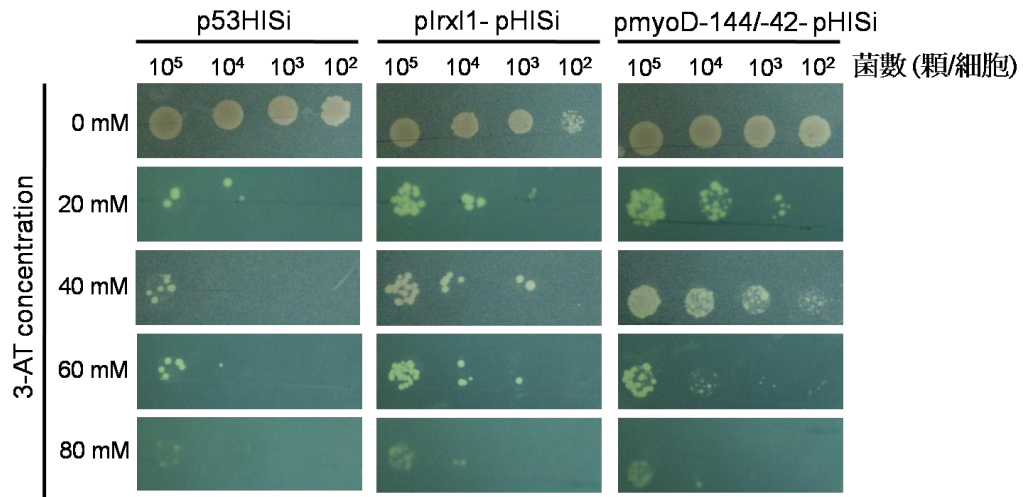
圖一、利用 Dual-luciferase reporter assay 發現 Mef2ca 會促進 *Irx11* promoter-172/+951 的活性。以 pGL3 promoter 作為 negative control，而將 *Irx11* promoter 縮短為-172/+951，在加入 Mef2ca-pCS2⁺時，測得的冷光活性上升，結果顯示 Mef2ca 對 *Irx11* 為促進的關係。而在 *Irx11* promoter +79/+951 及-1198/-1022 加入 Mef2ca 使 *Irx11* promoter 的活性下降，在 *Irx11* promoter +606/+724 的區域已沒有活性。



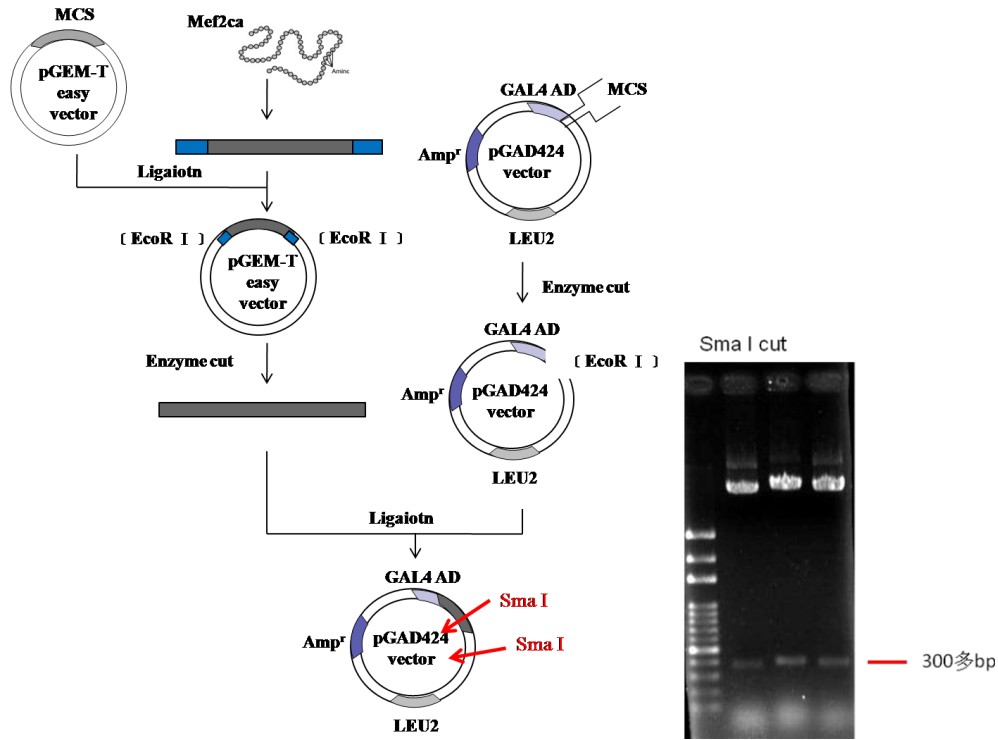
圖二、斑馬魚 *Irx11* promoter-1342/+951 選殖之質體與菌株建構。利用 EcoR I 將已接 pGEMT-easy 裡含酵素切點的 *Irx11* promoter 切下來，接在含 HIS3 Reporter gene 的 pHISi 質體上。抽完質體後，利用 AgeI、SacI 兩酵素切點 digest 確定為正接(500bp)。pHISi 長度為 6.8kb，*Irx11* promoter 為 2.3kb，由上圖可知，第一管有挑中。再經酵母菌轉型作用，建構 W303α [pHISi-*Irx11* promoter] 的菌株。成功在缺乏 uracil 的培養基中長出菌落；而以 p53HISi 質體作為 positive control。



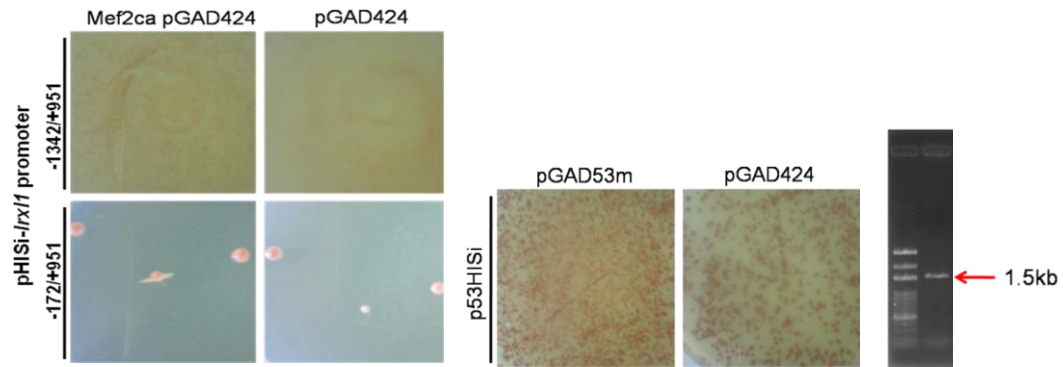
圖三、斑馬魚 pHisSi-Irx11 promoter -172/+951 選殖之質體。利用 Kpn I、Sac I 兩酵素切點，將接進 pGL3 basic 裡含酵素切點的 *Irx11* promoter 切下來，接在含 HIS3 reporter gene 的 pHisSi 質體上。抽完質體後，用 EcoR I、Kpn I 兩酵素切點 digest，確定 *Irx11* promoter 是否有接入 pHisSi 中。pHisSi 長為 6.8kb，*Irx11* promoter -172/+951 為 176kb，切出大小為 956bp，由上圖可知，有三管有挑中。



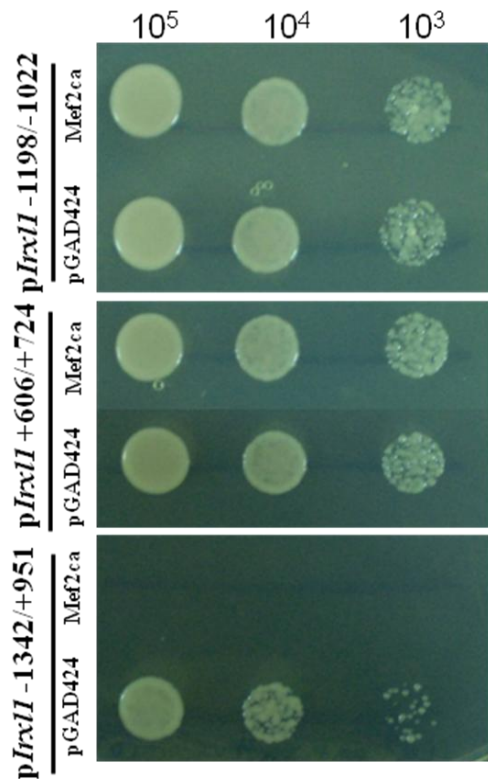
圖四、 測試 target gene-pHISi 所需使用的 3-AT 的濃度。在培養三天後，以缺乏 Uracil、Histidine 的培養基篩選下，觀察到在 60mM 的 3-AT 可抑制由 pHISi 質體上 minimal promoter 所產生的 leaky Histidine 表現，在細胞數約稀釋為 10³ 顆的情況下。



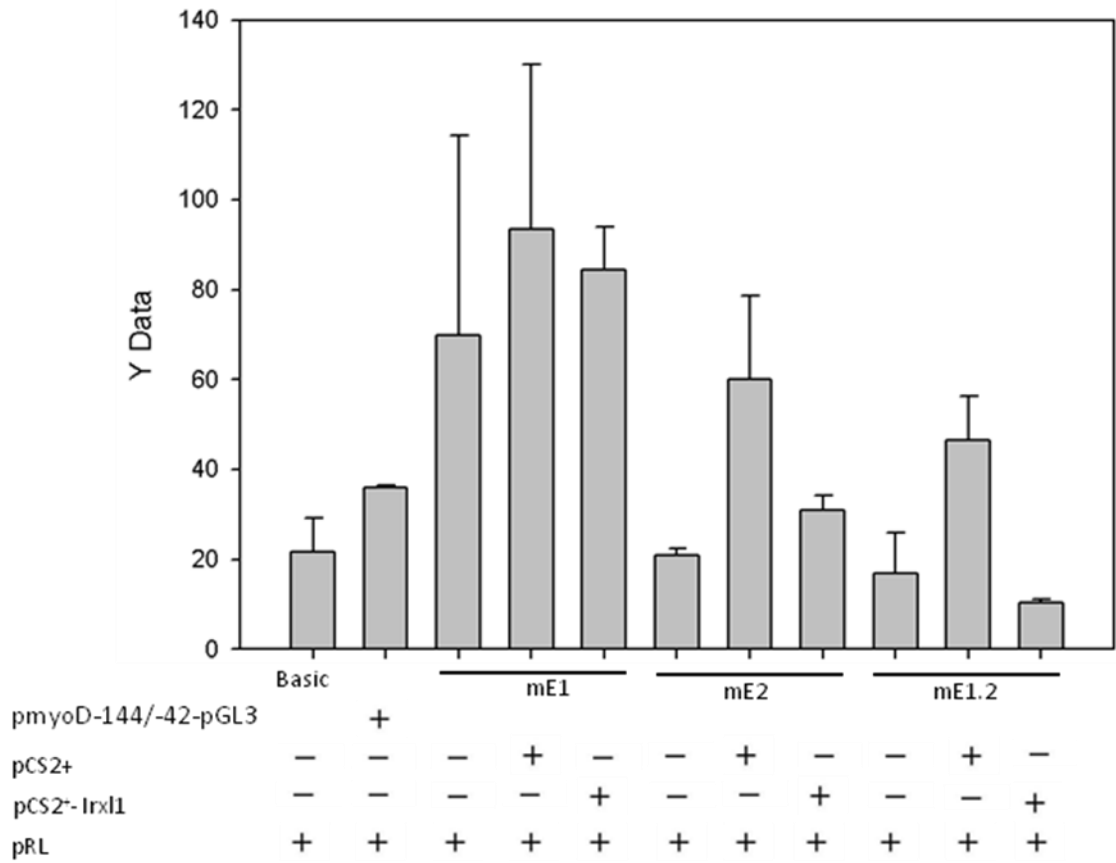
圖五、斑馬魚 Mef2ca 蛋白選殖之質體建構。利用 EcoR I 將已接 pGEMT-easy 裡含酵素切點的 Mef2ca 切下來，接在含 GAL4 AD 的 pGAD424 質體上。抽完質體後，利用 AgeI、SmaI 兩酵素切點 digest 確定為正接(361bp)。由上圖可知，三管皆有挑中。



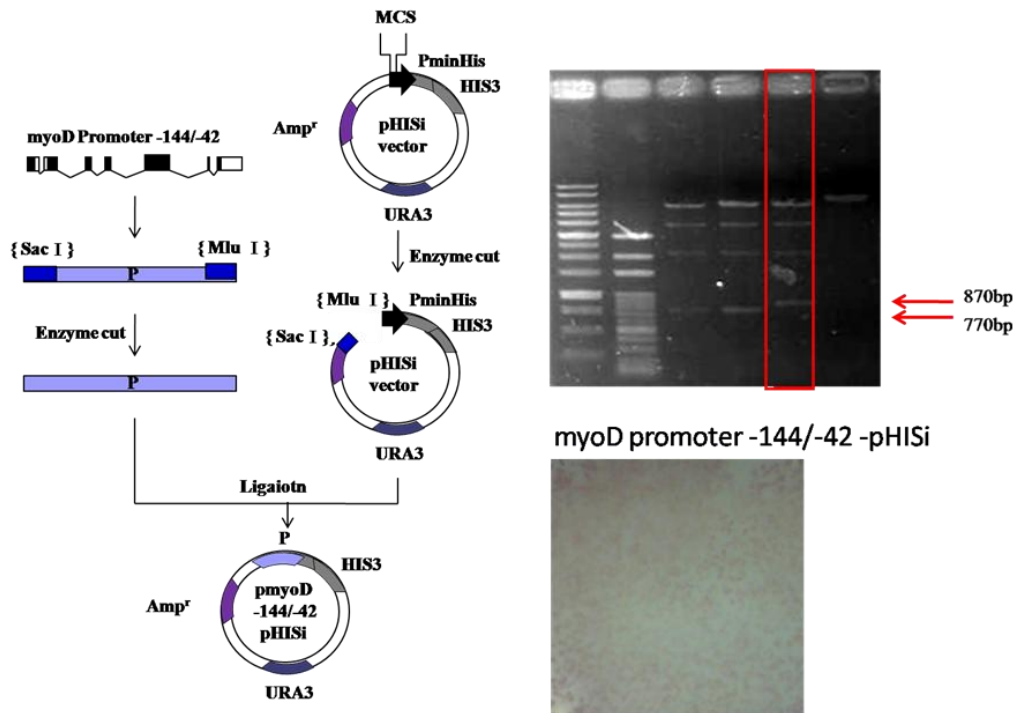
圖六、 W303α [pHISi-*Irx1* promoter -1342/+951、-172/+951+pGAD424-Mef2ca] 菌株的建構。經酵母菌轉型作用，成功在缺乏uracil、Histidine、Leucine的培養基中長出菌落，且利用p53HISi+ PGAD53m為positive control，分別加入pGAD424空質體作為negative control。再利用Yeast Colony PCR檢測出所要的菌株，經0.1NaOH處理後，利用選殖Mef2ca蛋白時所使用的primer進行PCR後，所產生的大小為Mef2ca全長(~1.5kb)，確認所挑出的菌株為正確的。



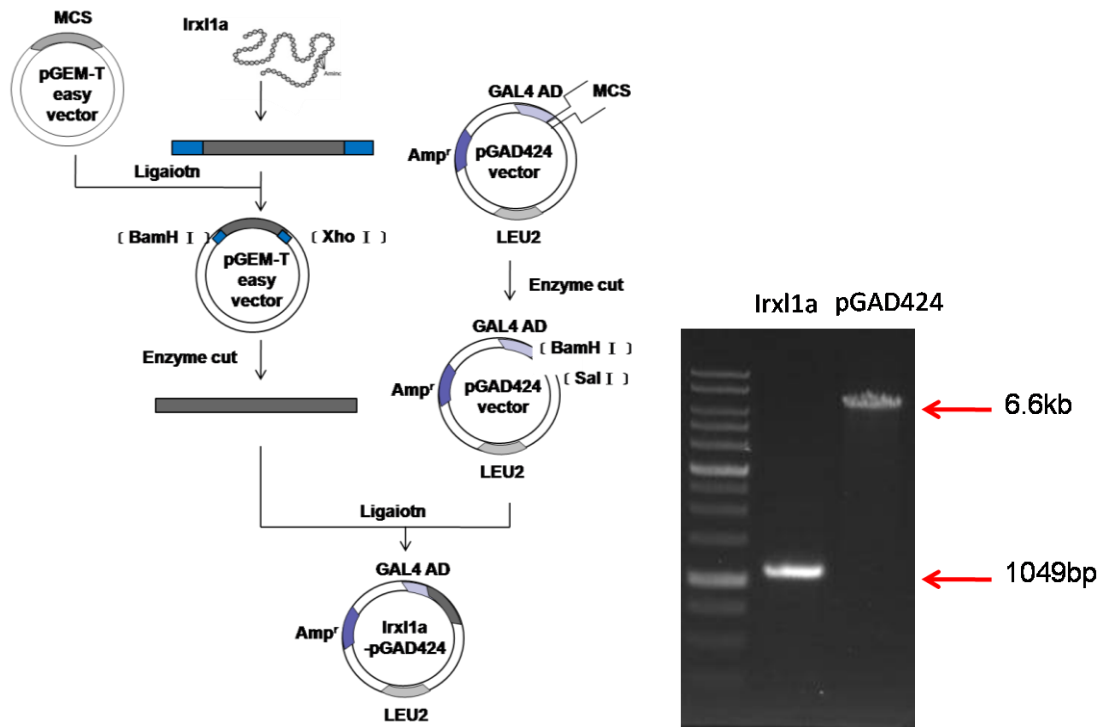
圖七、利用酵母菌單雜合法測定 *Irx11* promoter -144/-42 與 Mef2ca 蛋白的結合關係。W303α [p *Irx11* -1198/-1022 -pHISi] 及 W303α [p *Irx11*+606/+724 -pHISi]不論是否加入 Mef2ca-pGAD424，菌的生長情況將相同，所以無法直接推斷兩者有直接結合的調控。而 W303α [p *Irx11*-1342/+951 -pHISi]，在加入 Mef2ca-pGAD424 時，菌的生長情況反而較差，猜測 Mef2ca 可能也有抑制的能力結合在此區域內。



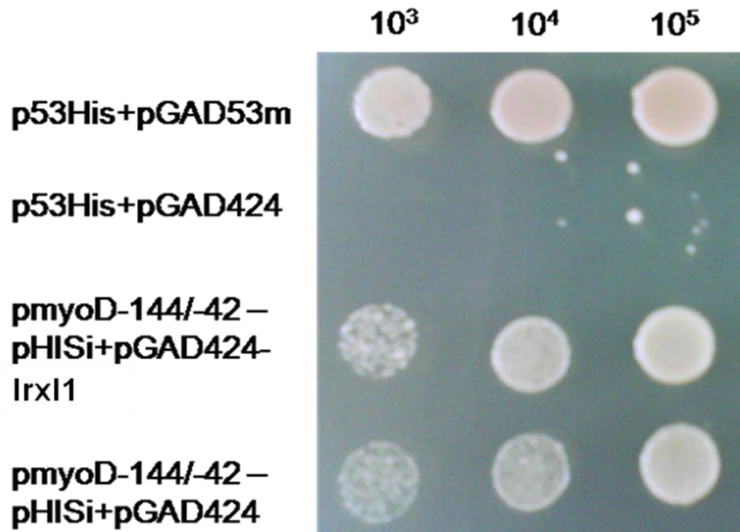
圖八、利用 Dual-luciferase reporter assay 發現探討 E-box 突變對 *myoD* promoter-144/-42 的活性影響。以 pGL3 promoter 作為 negative control，而將 *myoD* promoter -144/-42 在 E-box1、2 突變，結果顯示在加入 Irx11-pCS2⁺ 時，測得的冷光活性下降，與未突變者相同，結果顯示 E-box 非 Irx11 對 *myoD* promoter-144/-42 的調節區域。



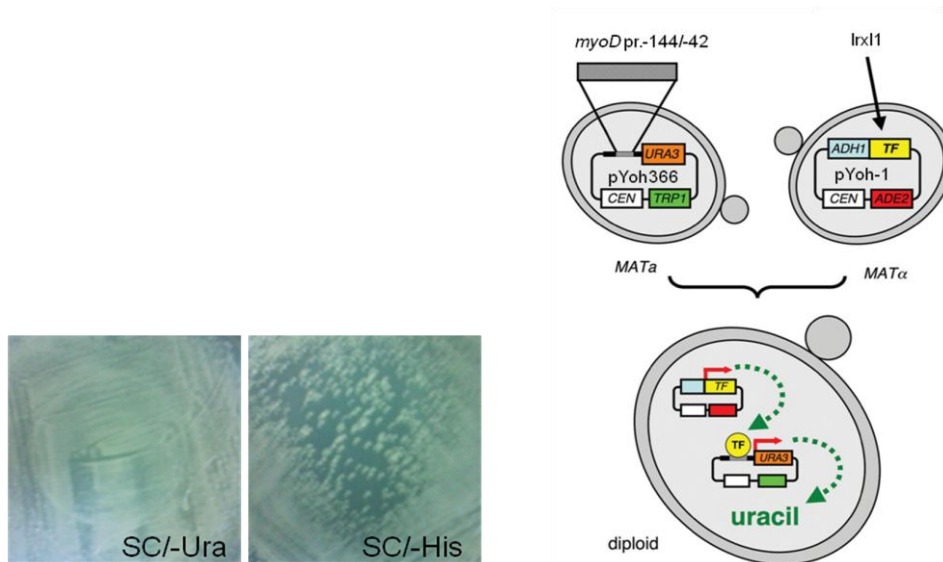
圖九、斑馬魚 *pHISi-myD* promoter -144/-42 選殖之質體與菌株建構。利用 *Sac*I、*Mlu* I 兩酵素切點，將 *myoD* promoter -144/-42 的 PCR 產物作酵素處理，接在含 *HIS3* reporter gene 的 *pHISi* 質體上。抽完質體後，用 *Eco*R I、*Kpn*I 兩酵素切點 digest，確定 *myoD* promoter -144/-42 是否有接入 *pHISi* 中。*pHISi* 長為 6.8kb，*myoD* promoter -144/-42 為 100bp，切出大小為 870bp，由上圖可知，有一管有挑中。經酵母菌轉型作用，成功在缺乏 Uracil、Hisitidine 的培養基中長出菌落。



圖十、斑馬魚 *Irx11a* 蛋白選殖之質體建構。利用 *Eco*R I 將已接 pGEMT-easy 裡含酵素切點的 *Irx11a* 切下來，接在含 GAL4 AD 的 pGAD424 質體上。pGAD424 長度為 6.6kb，*Irx11a* 為 1049bp。



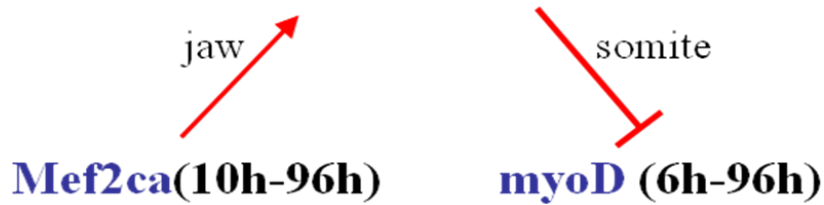
圖十一、利用酵母菌單雜合法測定 *myoD* promoter -144/-42 與 Irx11 蛋白的結合關係。在 W303α [pmyoD-144/-42 -pHISi+pGAD424- Irx11] 的菌生長情況，較 W303α [pmyoD-144/-42 -pHISi+pGAD424] 略稍微快速，約為 2~3 倍。可推測兩者有直接結合的調控。



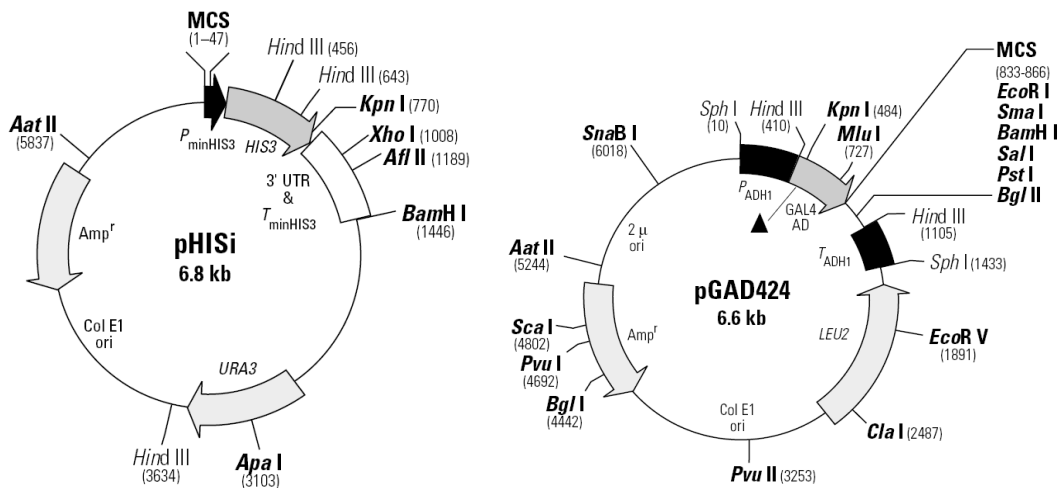
圖十二、W303α菌株不適用於此yeast one hybrid系統中。在一直無法將leaky的菌量表現以3-AT抑制下來，於是猜想說是否W303α這個菌株本身的genotype在某些胺基酸的缺失，可能不適用於此系統中，將此菌株塗在分別缺乏Uracil及Histidine的培養基上，即使在沒有任何質體轉型進入的情況下，卻可以生長。於是我將換一個酵母菌單雜合法的系統，再進行此實驗。

附圖

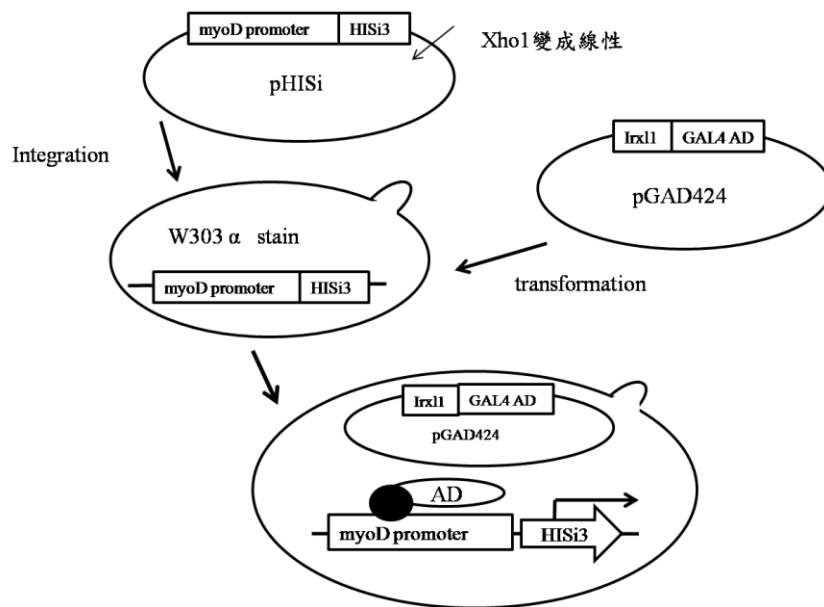
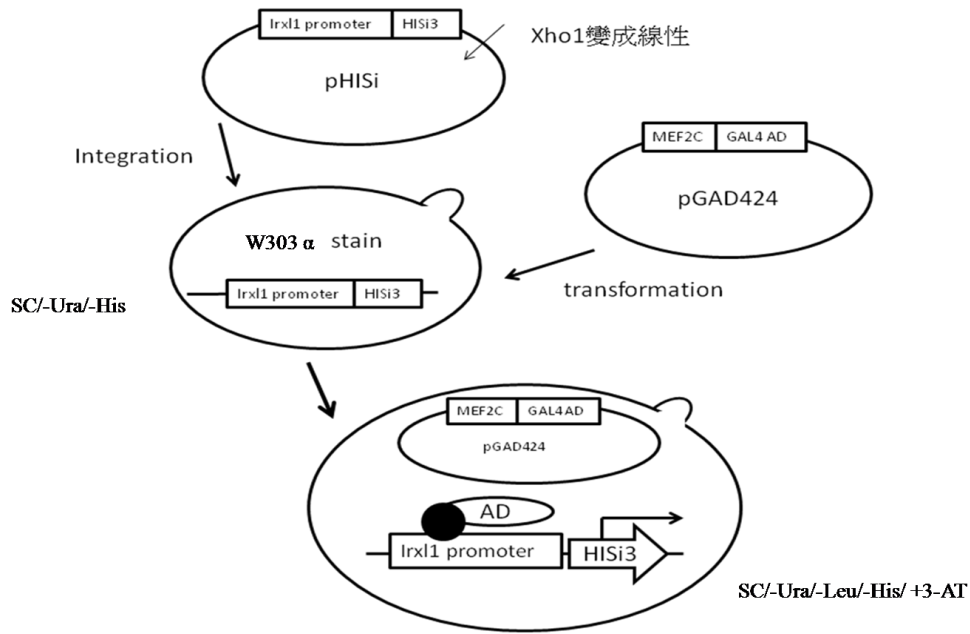
Irx11 (18h-120h)



(附圖一) Irx11與Mef2ca以及myoD之間的調控關係



(附圖二) Yeast one hybrid 所利用之兩種質體。pHISi 具有 *ura3* 及 *his3* 基因，可作為 selection marker，且 *his3* 基因為 reporter gene；而 pGAD424 具有 *leu2* 基因，作為 selection marker，且 GAL4 AD 可產生出蛋白結合至 DNA 的 upstream activation domain。Target gene-pHISi 若可與 fusion 蛋白相結合，則可啟動 *his3* 基因的表現。



(附圖三) 酵母菌單雜合法探討 *Irx1* 與 *Mef2ca* 以及 *Irx1* 與 *myoD* 的關係概略流程图

(附表一) 所有PCR用之Primer列表

Primer名稱	序列	用途
Irx11-8	5'-CGACTGCTTCTTTCCACCTC-3'	5' RACE-PCR
Irx11-15	5'-TTTGGGTGAACCCAGACTTC-3'	Promoter 及 調控區分析
Irx11E-2	5'-AAGCTCGAGGTATTTGTGGAGGAGAG-3'	蛋白表現; Xho I
Irx11E-13	5'-CGCGGATCCCAAAGATGAACACAATTG-3'	蛋白表現 ; BamH I
Irx11-19	5'-GCGGTACCAATGAAGTCAATGAGCATG-3'	Promoter 及調控 區分析; Kpn I
Irx11-22	5'-AGAGCTCAATGCGGCCAAACAAGATT-3'	Promoter 及調控 區分析; Sac I
Irx11-21	5'-GAGGTACCATGACTTTTGCGCGTTTGT-3'	Promoter 及調控 區分析; Kpn I
Irx11-24	5'-GGAGCTCGTGAGTTGACCCAGACGTA-3'	Promoter 及調控 區分析; Sac I
myoD promoter-13	5'-CCGGAGCTCCATCATGCTGTCAAATCAC-3'	Promoter 及 調控區分析
myoD promoter-4	5'-GGTACGCGTGGCCTGATAATAAACACACC-3'	Promoter 及 調控區分析

參考文獻

1. Krishanu Mukherjee, Thomas R. Burglin: Comprehensive Analysis of Animal TALE Homeobox Genes: New Conserved Motifs and Cases of Accelerated Evolution *J Mol Evol* 65:137–153, 2007.
2. Douglas M. Anderson, Jennifer Arredondo, Katherine Hahn, Graziela Valente, James F. Martin, Jeanne Wilson-Rawls, and Alan Rawls: Mohawk Is a Novel Homeobox Gene Expressed in the Developing Mouse Embryo. *Developmental Dynamics* 235:792–801, 2006.
3. Scott MP, Tamkun JW and Hartzell GW III: The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 989: 25–48, 1989.
4. Virginie Lecaudey, Isabelle Anselme, Renate Dildrop, Ulrich Ruther, Sylvie Schneider-Maunoury: Expression of the Zebrafish Iroquois Genes during Early Nervous System Formation and Patterning: *The Journal of Comparative Neurology* 492: 289–302, 2005.
5. Jun K. Takeuchi, Benoit G. Bruneau: *Irx11*, a divergent Iroquois homeobox family transcription factor gene. *Gene Expression Patterns* 7: 51–56, 2007.
6. Hsiao-Yun Cheng, Huichin Pan: Identification, Expression and Functional Analysis of a Novel Homeobox Gene, *Irx11*, in Zebrafish Embryonic Development: Master Thesis, Institute of Medicine, Chung Shan Medical University, 2007.
7. Michael P. Verzi, Pooja Agarwal, Courtney Brown, David J. McCulley, John J. Schwarz, and Brian L. Black: The Transcription Factor MEF2C Is Required for Craniofacial Development. *Developmental Cell* 12: 645–652, 2007.
8. Craig T. Miller, Mary E. Swartz, Patricia A. Khuu, Macie B. Walker, Johann K. Eberhart, Charles B. Kimmel: *mef2ca* is required in cranial neural crest to effect Endothelin1 signaling in zebrafish. *Developmental Biology* 308: 144–157, 2007.
9. Stephen J. Tapscott and Harold Weintraub: MyoD and the Regulation of Myogenesis by Helix-Loop-Helix Proteins. *J. Clin. Invest.* 87 (4): 1133–8.
10. Hung-Chieh Lee, Hsing-Yen Huang, Cheng-Yung Lin, Yau-Hung Chen, Huai-Jen Tsai: Foxd3 mediates zebrafish *myf5* expression during early somitogenesis. *Developmental Biology* 290 (2006) 359 – 372
11. Anderson, D.M., Beres, B.J., Wilson-Rawls, J., and Rawls, A. (2009). The homeobox gene Mohawk represses transcription by recruiting the sin3A/HDAC co-repressor complex. *Dev Dyn* 238, 572-580.
12. Han-Ni Chuang, Chia-Chi Wu, Hsiao-Yun Cheng, Huichin Pan: A novel homeobox gene, *Irx11*, is involved in pharyngeal arch and muscle morphogenesis during zebrafish embryonic development. Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan