

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

探討miRNA參與在CUG重複序列擴增及MBNL1 knockdown抑制肌纖維母細胞分化的角色(第3年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 102-2628-B-040-003-MY3  
執行期間：104年08月01日至105年10月31日  
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：潘惠錦  
共同主持人：蕭光明  
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：莊函霓  
碩士班研究生-兼任助理人員：曾珮萁  
碩士班研究生-兼任助理人員：林秀蘭  
大專生-兼任助理人員：陳皓年  
大專生-兼任助理人員：賴冠宇  
大專生-兼任助理人員：林冠宇  
博士班研究生-兼任助理人員：莊函霓

中華民國 106 年 02 月 15 日

中文摘要：肌強直肌肉形萎縮症(Myotonic dystrophy type I)，簡稱DM1，是屬於多系統性神經肌肉退化性疾病的一種單基因顯性的遺傳疾病，DM1病人的致病機制是在DMPK基因的3'-端非編碼區上的CUG重複序列擴增，而MBNL1會被吸引結合到CUG擴增，造成下游的基因失調。先前我們發現在肌纖維母細胞(C2C12)表現CUG重複序列擴增，在分化後的myoD mRNA與控制組相比無明顯差異，但在myoD蛋白質表現量是下降的，推測可能為轉錄後修飾的調控。近年在許多篇文獻有提到在DM1疾病當中，miRNA會參與其調控致病機制。我們利用Next Generation Sequencing (NGS) 來偵測C2C12-(CUG)200重複序列細胞中在分化前及分化後第三天的miRNA表現量，分化前總共偵測1061個miRNA，分化後偵測到975個，發現其中45%的miRNA有顯著改變。經過數據的分類、生物資訊的分析(mirTarBase)及查找文獻尋找下游基因，從這些失調的miRNA中挑出與DM1疾病或細胞週期或骨骼肌生成有關的miRNA，並以Q-PCR驗證在CUG200的細胞分化後miRNA的表現情況。我們發現miR-22-5p、miR-199b-5p、miR-218-5p在CUG200的細胞分化後表現量有顯著上升。利用miRWalk2.0預測這些miRNA可能的下游基因，再透過Gene Ontology分析這些基因所參與的生物路徑，顯示其參與調控的路徑包含骨骼肌細胞的分化、細胞增生、死亡、細胞週期等。在小鼠肌纖維母細胞中過度表現miR-218，會使MyoD基因的蛋白與mRNA表現受到抑制。在冷光報導分析的實驗中，我們將pre-mir-218和MyoD的3'端非編碼區一起轉染至HEK-293T細胞，冷光表現有下降的現象。另外，在C2C12細胞中過度表現miR-22, miR-29C, miR-100，在分化後第三天也會抑制myotube的形成，此結果顯示miR-218, miR-22, miR-29C, miR-100可能會負調控肌肉細胞的分化。之前發現在Mbnl1 knockdown的細胞中，MyoD的mRNA表現不變但蛋白表現量降低，暗示MyoD可能被miRNA調控。利用生物資訊網站TargetScan、Human miRNA Target預測可以結合在myoD 3'-UTR的miRNA，並與NGS data中在CUG 200細胞中為上調的miRNA進行交集，藉由Q-PCR及冷光報導實驗發現其中miR-193a和miR-682可能會結合至MyoD 3' UTR調控其活性；在C2C12中過量表現miR-193a和miR-682，可使MyoD蛋白質的表現量下降。另外，我們也從DM1病人纖維母細胞製備了不朽化細胞株，以備轉化成肌纖維細胞，能在更接近病人生理情況的模式中，觀察並驗證在小鼠肌纖維母細胞參與的miRNA的調控。

中文關鍵詞：強直型肌肉萎縮症第一型(DM1)、CUG擴增、MBNL1抑制、miRNA、myoD、C2C12肌母細胞、肌細胞分化

英文摘要：Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a multisystemic dominant disease caused by expansion of CUG repeats in the 3'-UTR of the DMPK gene. In DM cells, the MBNL proteins are sequestered by CUG repeats to form RNA foci, leading to defects in alternative RNA splicing that are linked to the pathologic features. Based on previous data we speculated that myoD may be regulated posttranslationally. In this study, we test if myoD can be regulated by miRNA. We monitored miRNA expression in C2C12-CUG200 cells by NGS, and found 45% was significantly altered during the

differentiation course. By bioinformatics and qRT-PCR, the NGS data are analyzed and validated. miR-22-5p, miR-199b-5p, miR-218-5p were consistently and significantly up-regulated in differentiated CUG200 cells. The target genes were predicted by miRWalk2.0 and then analyzed by KEGG pathway and Gene Ontology (GO). The result revealed that the target genes were involved in biological processes including regulation of cell proliferation, cell cycle, cell death and striated muscle differentiation. Overexpression of miR-218 reduced the protein and mRNA levels of MyoD gene, consistent with that observed in CUG200 cells. Luciferase reporter assay also indicated miR-218 can regulate MyoD 3' UTR. Overexpression of miR-22, miR-29C, miR-100 in C2C12 cells also suppress myotube formation, indicating that these miRNAs negatively regulate the differentiation of myoblasts. Bioinformatics softwares were used to predict miRNAs that may target myoD 3' UTR and which also are up-regulated in C2C12-(CUG)200 cells. Two of them, miR-193a and miR-682 were tested with MyoD 3' UTR by reporter assays and found to inhibit the reporter activity, and overexpression of miR-193a or miR-682 in C2C12 cells resulted in reduction of myoD protein level. In addition, we generated immortalized cell lines from DM1 patients' fibroblasts, by which we will use to make myoblasts for further analysis and validation of miRNAs found in C2C12.

英文關鍵詞：myotonic dystrophy type 1(DM1), CUG expansion, MBNL1 knockdown, miRNA, myoD, C2C12 myoblasts, myogenic differentiation

## 中文摘要

肌強直肌肉形萎縮症(Myotonic dystrophy type I)，簡稱 DM1，是屬於多系統性神經肌肉退化性疾病的一種單基因顯性的遺傳疾病，DM1 病人的致病機制是在 DMPK 基因的 3'-端非編碼區上的 CUG 重複序列擴增，而 MBNL1 會被吸引結合到 CUG 擴增，造成下游的基因失調。先前我們發現在肌纖維母細胞(C2C12)表現 CUG 重複序列擴增，在分化後的 *myoD* mRNA 與控制組相比無明顯差異，但在 *myoD* 蛋白質表現量是下降的，推測可能為轉錄後修飾的調控。近年在許多篇文獻有提到在 DM1 疾病當中，miRNA 會參與其調控致病機制。我們利用 *Next Generation Sequencing* (NGS) 來偵測 C2C12-(CUG)200 重複序列細胞中在分化前及分化後第三天的 miRNA 表現量，分化前總共偵測 1061 個 miRNA，分化後偵測到 975 個，發現其中 45% 的 miRNA 有顯著改變。經過數據的分類、生物資訊的分析(mirTarBase) 及查找文獻尋找下游基因，從這些失調的 miRNA 中挑出與 DM1 疾病或細胞週期或骨骼肌生成有關的 miRNA，並以 Q-PCR 驗證在 CUG200 的細胞分化後 miRNA 的表現情況。我們發現 miR-22-5p、miR-199b-5p、miR-218-5p 在 CUG200 的細胞分化後表現量有顯著上升。利用 miRWalk2.0 預測這些 miRNA 可能的下游基因，再透過 Gene Ontology 分析這些基因所參與的生物路徑，顯示其參與調控的路徑包含骨骼肌細胞的分化、細胞增生、死亡、細胞週期等。在小鼠肌纖維母細胞中過度表現 miR-218，會使 MyoD 基因的蛋白與 mRNA 表現受到抑制。在冷光報導分析的實驗中，我們將 pre-mir-218 和 MyoD 的 3'端非編碼區一起轉染至 HEK-293T 細胞，冷光表現有下降的現象。另外，在 C2C12 細胞中過度表現 miR-22, miR-29C, miR-100，在分化後第三天也會抑制 myotube 的形成，此結果顯示 miR-218, miR-22, miR-29C, miR-100 可能會負調控肌肉細胞的分化。之前發現在 Mbnl1 knockdown 的細胞中，MyoD 的 mRNA 表現不變但蛋白表現量降低，暗示 MyoD 可能被 miRNA 調控。利用生物資訊網站 TargetScan、Human miRNA Target 預測可以結合在 myoD 3' -UTR 的 miRNA，並與 NGS data 中在 CUG 200 細胞中為上調的 miRNA 進行交集，藉由 Q-PCR 及冷光報導實驗發現其中 miR-193a 和 miR-682 可能會結合至 MyoD 3' UTR 調控其活性；在 C2C12 中過量表現 miR-193a 和 miR-682，可使 MyoD 蛋白質的表現量下降。另外，我們也從 DM1 病人纖維母細胞製備了不朽化細胞株，以備轉化成肌纖維細胞，能在更接近病人生理情況的模式中，觀察並驗證在小鼠肌纖維母細胞參與的 miRNA 的調控。

**關鍵詞：**強直型肌肉萎縮症第一型(DM1)、CUG 擴增、MBNL1 抑制、miRNA、*myoD*、C2C12 肌母細胞、肌細胞分化

## 英文摘要

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a multisystemic dominant disease caused by expansion of CUG repeats in the 3'-UTR of the myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) gene. In DM cells, the muscleblind-like (MBNL) proteins are sequestered by the double-stranded CUG repeats to form RNA foci, leading to defects in alternative RNA splicing that are linked to the pathologic features. Previously, we found myoD protein levels, but not RNA, were decreased in C2C12 myoblasts expressing CUG expansion or in myoblasts with *mbnl1* knockdown. So, we speculated that it might be for regulation of posttranslational modifications. Because miRNAs are involved in the pathogenesis of DM1, we test the hypothesis that myoD can be regulated by miRNA. We have monitored miRNA expression in C2C12-(CUG)200 cells by *Next Generation Sequencing* (NGS). Before differentiation, 1061 miRNAs were detected, whereas a total of 975 miRNAs were detected after cell differentiation, among them expression of 45% of miRNAs was significantly altered. By bioinformatics software (mirTarBase) analysis and qRT-PCR validation, we selected several miRNAs that are up-regulated during differentiation course in C2C12-(CUG)200 cells. Among these, the miRNAs which were associated with DM1 disease, cell cycle control or skeletal muscle generation were selected and further analyzed for their expression in differentiation medium on day 3 (DM3) relative to in growth medium (GM) by real-time RT-PCR. miR-22-5p, miR-199b-5p, miR-218-5p were consistently and significantly up-regulated in differentiated CUG200 cells. The target genes were predicted by miRWalk2.0 and then analyzed by KEGG pathway and Gene Ontology (GO). The result revealed that the target genes were involved in biological processes including regulation of cell proliferation, cell cycle, cell death and striated muscle differentiation. The precursors of these miRNAs were cloned respectively and transfected into C2C12 cells to evaluate their effect on target gene expression. We found that overexpression of miR-218 reduced the protein and mRNA levels of MyoD gene, consistent with that observed in CUG200 cells. Luciferase reporter assay also indicated miR-218 can regulate MyoD 3'UTR. Overexpression of miR-22, miR-29c, miR-100 in C2C12 cells also suppress myotube formation, indicating that these miRNAs negatively regulate the differentiation of myoblasts. Previously in *Mbnl1* knockdown C2C12 cells, we found that protein but not mRNA of MyoD was decreased. Bioinformatics software (TargetScan, Human miRNA Target) was used to predict miRNAs that may target myoD 3'UTR and which also are up-regulated in C2C12-(CUG)200 cells. Two of these miRNAs are miR-193a and miR-682. Transfection of miR-193a or miR-682 and MyoD 3'UTR reporter into HEK-293T cells results in down-regulation of the reporter activity, and overexpression of miR-193a or miR-682 in C2C12 cells results in

reduction of myoD protein level. The NGS data of C2C12-(CUG)<sub>200</sub> compared with control cells during differentiation had been analyzed and validated. In addition, we have generated immortalized cell lines from DM1 patients' fibroblasts, by which we will use to make myoblasts for further analysis and validation of miRNAs found in C2C12.

**Keywords** : myotonic dystrophy type 1(DM1), CUG expansion, MBNL1 knockdown, miRNA, myoD, C2C12 myoblasts, myogenic differentiation

## 前言

### 強直型肌肉萎縮症

強直型肌肉萎縮症(myotonic dystrophy or dystrophia myotonia, 簡稱DM)是一種體染色體顯性神經肌肉退化遺傳性疾病 (1)。此疾病常見於歐美國家，盛行率約為8000分之1，而在台灣則屬於罕見疾病，盛行率低於100000分之1 (2)。其臨床症狀主要為肌強直、肌肉漸進性萎縮無力及萎縮和心律不整等，另有一些非肌肉相關的症狀包括糖尿病、白內障、智能缺陷、禿頭、生殖器官萎縮、不孕症、內分泌系統異常等，屬於多系統神經肌肉疾病(multi-systemic neuromuscular disorder) (3)。DM疾病依照其核酸序列擴增位置不同區分為兩種類型，DM1及DM2，兩者的臨床症狀類似。DM1占約所有DM病例的98%，其致病原因是人類第19對染色體長臂(19q13.3)位置上*DMPK* gene的三端非轉譯區(3'-untranslated region, 3'-UTR)內有CTG重複序列異常擴增所導致，且隨著CTG重複的次數越多病人的症狀也越嚴重，發病的年齡越早，而重複次數超過1000次會造成先天性強直型肌肉萎縮症(congenital myotonic dystrophy; CDM)，這類型的病人在嬰兒時期就會出現低肌張和智能遲緩等症狀 (4)。DM2則是在3q21上的*zinc finger 9 (ZNF9)* gene的第一個intron中，發生CCTG四聯核酸重複序列擴增，CCTG擴增次數約為75~11,000次 (5)。DM1與DM2產生的臨床症狀相似，但在DM2中並無先天性案例。

### DM的致病機轉

目前DM的致病分子機轉為重複序列異常擴增後，RNA gain-of-function所導致。DM1和DM2都有大量的CUG/CCUG擴增突變的RNA，在細胞核內形成穩定的hairpin二級結構 (6)，並吸引許多RNA結合蛋白結合，例如CUG-BP and ETR-3 like factor(CELF)和MBNL (muscleblind-like protein)兩大家族蛋白質 (7)，在細胞核內形成RNA foci (8)，進而改變這些蛋白質的正常生理功能。伴隨著MBNL1蛋白質被阻擋在核內，原本會結合至CUG重複序列的CUG-BP蛋白質被過度磷酸化，使CUG-BP蛋白維持穩定，不易被降解，造成其表現量上升 (9)。MBNL具有調控基因選擇性剪接的功能，其與CUG-BP是以拮抗(antagonistic)方式調控下游基因，如cardiac troponin T(cTNT)、muscle-specific chloride channel (ClC-1)、insulin receptor (IR)等(10, 11)，而導致心律不整、肌強直、胰島素被抑制等症狀。在DM疾病中會有Mbnl1缺失(loss-of-function)以及CUG-BP過度表現(gain-of-function)的現象。Mbnl1 基因剔除的小鼠，可出現類似於 DM 病人的肌強直、白內障及基因剪輯異常(12)，而過度表現CUG-BP1的轉殖基因小鼠也會出現與DM相關的病理特徵和基因剪接失調的現象(13)。而在 DM1 疾病小鼠模式中過量表達MBNL1 可以糾正肌強直和 RNA 錯誤剪輯(14)。除此之外，MBNL1 最近也被發現可參與 miR-1 代謝的調節，此與 DM1 病人的心臟缺陷有關(15)。

### 三聯核酸序列擴增造成miRNA失調

近來許多研究顯示 miRNAs 可能參與在神經退化性疾病的致病機轉，其中包括由 CAG 重複序列擴增導致的 SCA1 和 Huntington's disease (16, 17)。過去有文獻指出，擴增的CNG重覆序列會影響miRNA的生合成，CNG重覆序列對於RNA結合蛋白(RNA binding protein)具有親和力，它會吸引Mbnl1 (15)，RNA解旋酶(RNA helicases) p68、p72 (18)這類的蛋白結合，這些蛋白的缺失會使下游基因的剪切異常，導致DM的症狀。近期研究發現，CNG重複序列會吸引Drosha和DGCR8這類的複合蛋白，導致miRNA生合成失調。Drosha是種巨大的複合蛋白，它包含了DEAD-box RNA helicases p68(DDX5)和p72(DDX17)和nuclear factor 90(NF90)和NF45 (19)，當p68、p72被重複序列吸引結合後，便導致miRNA生合成出現問題 (18)染色體脆折症(FXTAS, Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome)是由FMR1基因的5'-UTR有CGG擴增所導致，而這個重複序列的結構與primary-miRNA相似，使得 Drosha和DGCR8被吸引結合到此結構上，引起miRNA失調造成病狀(20)。

### miRNA在DM1疾病中的影響

越來越多的證據顯示 miRNAs 也可能參與在 DM1 的致病機轉，較具指標性的研究是關於 miR-1 的研究。LIN28和LIN28 binding proteins 會與 TUT4 作用，使 pre-miR-1 的尾端形成uridylation，讓 Dicer 無法作用(21)，因而無法生成 mature 的 miR-1。而 MBNL1可與 LIN28 競爭結合在 pre-miR-1 loop 中的 UGC motif。在 CUG 重複序列擴增突變的細胞中，MBNL1 的耗盡造成 LIN28 結合至 pre-miR-1 上，使 mature 的 miR-1 減少，下游基因因而過度表現，造成心臟的缺陷(15)。除了miR-1之外，在DM1疾病中也發現了一些myomiR的失調，例如miR-206 (22)、miR-335過度表現在DM1病人組織中，miR-29b、miR-29c、miR-33在DM1病人組織中變少 (23)，另外也發現myomiR中miR-1，miR-133b，miR-206的失調和mislocalization，顯示這些miRNA可能會參與DM1的肌肉組織病理機制(24)。但是目前的研究結果分歧，尚無明確的定論。

### miRNA在骨骼肌中的調控

miRNA參與許多生物程序的調控，其中包含了骨骼肌在胚胎發育或成體修復損傷肌肉組織過程的調控。例如miR-195、miR-497維持satellite cells quiescent的狀態 (25)，miR-675-5p、miR-675-3p促進分化 (26)。此外，特定在肌肉(心臟和骨骼肌)中表現並參與調控的miRNA又被稱為myomiR，包含miR-1、miR-133a、miR-206 (27, 28)，後期又有文獻指出miR-208a、miR-208b、miR-499、miR-486等等也參與了其中之調控 (29)。而MyoD這類的MRFs也被證實會透過被miRNA調控或調控miRNA的表現影響細胞分化，像是miR-181抑制Hox-A11使MyoD表現上升(30)，MyoD和MyoG調控miR-214表現使它抑制目標基因Ezh2促進分化進行(31)，MyoD調控miR-206抑制Fstl1和Utrn表現幫助分化(32)等。

## 研究目的

實驗室先前的實驗結果顯示，在 C2C12 肌纖維母細胞中若表現 CUG 重複序列或是 knockdown MBNL 會使細胞分化能力受到抑制，且 MyoD protein level 明顯下降，但是 MyoD RNA level 並無顯著差異。若將 myoD 表達質體送入表現重複序列 CUG 200 之細胞，則可以改善細胞分化的情形(33)。我們推測 MBNL 對於 MyoD 基因表現的調控是在轉錄後(posttranscriptional)的階段。我們猜測 MBNL1 是否可能 recruit 某些 miRNA 使其無法結合至 MyoD 3'UTR，而 MBNL1 knockdown 時這些 miRNA 則被釋放出來結合至 MyoD 3'UTR，導致 MyoD mRNA 不穩定或 translation 的產物減少進而影響分化能力。因此首先我們將檢測 MBNL1 knockdown 造成的 myoD 下降是在轉譯前還是轉譯後的調控。並探討 myoD 3'UTR 序列是否受 miRNA 調控。

其次，為了找出可能參與 CUG 擴增或 MBNL1 knockdown 造成肌細胞分化抑制的 miRNA，進一步我們也以 NGS 進行小分子 RNA 定序，分析在細胞中表現明顯上調或下調的 miRNA，再進行下游基因表現的確認。

## 研究方法

1. 建立穩定表達 CUG200 (pEGFP-CUG200) 的 C2C12 細胞株，以及相應作為對照組的 control 細胞株 (pEGFP-N3)。
2. 以 NGS (next generation sequencing) 小分子定序分析在表現 pEGFP-CUG200 和對照組細胞中表現明顯上調或下調的 miRNA，選定出候選的 miRNA。
3. 利用 Real-time quantitative PCR 驗證候選的 miRNA，並將驗證過的 miRNA 去建立過度表達 miRNA 的載體。
4. 建構表達 pCS<sup>2+</sup> DsRed-pre-mir 和 pEGFP-pre-mir 的載體
5. Transfect 過度表達 miRNA 的載體至 C2C12 細胞，觀察細胞分化能力以及型態和蛋白質的表現量。
6. 以生資軟體尋找出候選 miRNA 相關的基因，並且預測出 GO pathway，尋找出下游正確的目標基因。
7. 以生資軟體預測會結合至 MyoD 3'UTR 的 miRNA 並且結合 NGS 的結果尋找出可能會結合至 MyoD 3'UTR 的候選 miRNA。
8. 利用 Real-time quantitative PCR 分析和 dual-luciferase reporter assay 在 MyoD 3'UTR 的候選 miRNA 中尋找出對 MyoD 3'UTR 有影響的 miRNA。

## 材料與方法

### 1. 細胞培養

此研究中使用之細胞株包括 C2C12 小鼠肌纖維母細胞(skeletal muscle myoblast)、HEK 293T cell 人類胚胎腎細胞、Hela cell、human primary DM1 fibroblast cell 人類 DM1 初代纖維母細胞(GM07492 為正常人的細胞、GM03987、GM04033、GM03989 分別為 CTG 重覆 500、1000、2000 次的病患細胞)，購自 Coriell Institute for Medical Research，皆以 37.0°C，5%的 CO<sub>2</sub> 條件下培養。

C2C12 培養於 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco)、10%胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS; Gibco)、penicillin/streptomycin (1% P/S; Gibco)、L-glutamine (4mM; Gibco)。欲進行分化實驗時，先以 Growth medium(GM)培養 C2C12 細胞至密度約九分滿，將培養液置換為 Differentiate medium (DM)，含 DMEM、1% P/S、4mM L-glutamine、2%馬血清(Horse serum; Gibco)以誘導細胞分化。培養 CUG 重複序列之細胞培養基需加入 500µg/ml G418，knock down Mbn1l 的細胞需加入 2µg/ml puromycin。Hela 的培養液同 C2C12 GM 培養液，HEK 293T cell 則為 DMEM、0.1% P/S、10% FBS，約 9 分滿時進行繼代培養。Human primary DM1 fibroblast cell 則是培養於 DMEM、15% FBS、Antibiotic-Antimycotic (1X anti-anti; Gibco)、Nonessential amino acid solution (1X NEAA; Gibco)，約 9 分滿時進行繼代培養。不朽化後的細胞培養液需加入 0.6 µg/ml puromycin，轉為 myoblast 後培養液則需再加入 0.6 mg/ml G418。

### 2. 慢病毒製備與感染

慢病毒製備: shMbn1l 質體 (TRCN0000102630、TRCN0000102633、TRCN0000102634)購自 RNAiCore，將 5x10<sup>6</sup> 個 HEK293T 細胞種至培養皿中，隔天以 PBS 清洗後加入 10ml 新鮮的培養液，並配製質體混和物(8.1µg pCMV-ΔR8.91、0.9µg pMD.G、9µg lentiviral shRNA plasmid)於 1.5ml tube 中混合均勻，再緩慢加入 12.5 mM CaCl<sub>2</sub> 靜置 5 分鐘、再加入 2X HEPES-Buffered Saline (HBS; Promega)到 tube 中並於室溫靜置 7 分鐘，接著將 tube 中的混合液均勻滴入 10cm 培養皿中，置於培養箱中培養 10 小時後，換成新的培養液。再放入培養箱培養 36~48 小時。感染 C2C12 的病毒液需為新鮮且進行病毒濃縮過的，體積比 Lenti-X™ Concentrator：病毒濾液= 1：3 (Takara Bio Company)，混合均勻後於 4 °C 反應 overnight，再以 4°C 離心 1500g、45 分鐘，最後移除上清液，以 100µl 回溶即是濃縮 100 倍的病毒液，可存放於 -80°C。

慢病毒感染: 將 4x10<sup>4</sup> 個 C2C12 細胞種於 6cm dish 中，再加入 8 µg/ml polybrene 到培養液中，接著加入 100µl 濃縮病毒液進行感染，隔天再換成新的培養液，讓細胞進行復原(recover)一天，感染後第二天將培養液換為含有 2µg/ml puromycin 培養液，篩選七天可得 stable shRNA cell lines。

### 3. 即時定量聚合酶連鎖反應

RNA 萃取與定量: 細胞以 TRI reagent 萃取 total RNA, 再以 Phenol/Chloroform (1:1, pH4.3) 純化, 酒精沉澱, 最後以 DEPC 水回溶。取 1 $\mu$ l 的 RNA 進行 1% 的 DNA 膠電泳, 確認 RNA 的品質 (18S、28S)。以 NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo) 分析 RNA 濃度及純度。

mRNA Q-PCR: 定量 PCR 所使用的儀器為 Step One Plus™ (ABI), Fast SYBR® Green Master Mix (1X SYBR; Life)、將 Forward 與 Reverse primer 混合稀釋成 (primer-Mix 0.5 $\mu$ M) 2 $\mu$ l, cDNA (稀釋 128 倍) 1 $\mu$ l, 補 d2H<sub>2</sub>O 至 10 $\mu$ l, 混合均勻後, 便可上機, Q-PCR 反應的條件為: stage 1: 95°C, 10 分鐘; stage 2: 95°C, 15 秒、60°C, 1 分鐘, 重複 40 個循環。反應完成後, 紀錄 Ct 值, 與 GAPDH (internal control) 的 Ct 值後, 計算出  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 即為相對定量的數值。

miRNA Q-PCR: 同上將 Specific Forward primer 與 miRNA Universal Reverse primer 混合稀釋成 (primer-Mix 0.5 $\mu$ M) 2 $\mu$ l, cDNA (稀釋 32 倍) 1 $\mu$ l, Q-PCR 反應的條件為: stage 1: 95°C, 10 分鐘; stage 2: 95°C, 15 秒、60°C, 1 分鐘, 重複 40 個循環; stage 3: 95°C, 15 秒、60°C, 1 分鐘、95°C, 15 秒。反應完成後, 紀錄 Ct 值, 與 U6 (internal control) 的 Ct 值後, 計算出  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 即為相對定量的數值。

### 4. 西方墨點法

收取蛋白萃取物後, 以 SDS-PAGE 進行膠體電泳, 再轉漬到 PVDF 上。將轉漬過的 PVDF 膜以 7% 脫脂奶粉或 3% Bovine serum albumin (BSA) 進行阻斷 (blocking) 避免背景有雜蛋白, 浸泡 1~2 小時, 以 TBST buffer (20 mM Tris、137 mM NaCl、0.2% Tween 20, pH 7.4) 清洗數次。根據目標蛋白加入一級抗體, 於 4°C 浸泡至隔天, 再以 TBST buffer 數次。再根據一級抗體的種類加入二級抗體, 浸泡一小時, TBST buffer 數次。最後以 ECL system (Western Lightning™ Plus-ECL, PerkinElmer Inc) 與 PVDF 膜片上的二級抗體作用並產生冷光, 再以底片進行感光成像。

## 5 生物資訊軟體分析

miRNA 目標基因預測

利用 MICROT-CDS

([http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index))

將其 miTG score 設為大於 0.7, TargetsCan-mus ([http://www.targetscan.org/mmu\\_61/](http://www.targetscan.org/mmu_61/))

將其 Aggregate PCT 設為大於 0.7, 再彼此交集比對, MiRDB

(<http://mirdb.org/miRDB/>) 將其 score 設為大於 60。

Gene Ontology (GO) 基因分群分析與 KEGG 生物途徑分析

利用 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) 網站, 來分析相關的 GO pathway, 包含 molecular function (MF)、cellular component (CC)、biological process (BP), 我

們分析的是 BP 分群，首先先輸入基因，之後選擇物種，點選想看的分析結果。

## 6. 實驗質體製備

一般流程:利用 C2C12 細胞的 genomic DNA 作為模板，利用 primer set，forward 與 reverse 序列為，進行 PCR 放大所需的片段，回收產物後，將 insert 和 vector 進行酵素切，回收被切好的 insert 和 vector 進行 ligation，之後利用 DH5 $\alpha$  transform，挑中 clone 後就可以定序確認，進行後續實驗。

定點突變(point mutant)與 PCR deletion: 製備縮短及突變的質體則是利用定點突變或 PCR Deletion 透過設計的引子，將序列突變或切成不同的片段。primer 設計為將要 deletion 的片段前方以及後方的序列併為 forward primer，互補股為 reverse primer。養菌 16 小時後，以 QIAGEN® Spin Miniprep 製備質體。PCR 反應結束後，加入 1  $\mu$ l Dpn I (NEB)，在 37°C 下進行酵素切 1.5 小時。將不含突變點的模板 DNA 切開，只保留含有突變點的 DNA。再將稀釋 10 倍的 PCR 產物轉殖 (transform) 進入菌體 (competent cell-DH5 $\alpha$ )，讓含有突變點的環型 DNA 成功在菌體中複製。再利用定序的方式確認突變點的存在，即產生含 mutation 或 deletion 的質體。

## 7. 雙色冷光偵測系統

pGL3 control-musMyoD 3'-UTR 帶有 firefly luciferase 報導基因及 MyoD 3'-UTR 序列;pRL-TK 則是哺乳動物細胞中可持續表現 Renilla luciferase 的質體，可作為 firefly luciferase vector 報導者活性的 internal control。

在 transfect 的隔天將 co-transfected pGL3 control 和 pRL-TK 質體的細胞，用 PBS 清洗，並加入 1X Passive Lysis Buffer 500 $\mu$ l 於室溫下，置於搖盪機上反應 20 分鐘，在低溫離心以最高轉，離心一分鐘。之後以 10 $\mu$ l 細胞萃取液加上 Luciferase Assay Reagent II 25 $\mu$ l，以 luminometer 做 firefly luciferase 冷光測試，測試完後加入 Stop & Glo TM Reagent 25 $\mu$ l 以抑制 firefly 反應同時也活化 Renilla luciferase，亦用 luminometer 做 Renilla luciferase 冷光測試，由二者比值量化 luciferase 的活性。

## 8. 不朽化人類 DM1 初代纖維母細胞

製備完 pLAS5w-Ppuro-hTERT 的不朽化病毒表現載體後，我們將此質體送請中研院 RNAiCore 核心設施進行病毒液製備，並測量病毒效價，我們得到的病毒效價為 8469 RIU/ul。第一天將人類 DM1 初代纖維母細胞 2.6x10<sup>5</sup> 個種於 6 公分盤中，隔天將病毒液置於冰上退冰，加入 8 $\mu$ g/ml polybrene 到培養液中，再加入病毒液(以 M.O.I 為 1 或 1.5 的比例)感染初代細胞，隔天換成新的培養液，讓細胞進行復原(recover)一天，第四天將培養液換為含有 0.6  $\mu$ g/ml puromycin，篩選七天可得不朽化的人類 DM1 纖維母細胞。利用我們設計的 hTERT PCR 確認用的 primer，對不朽化細胞 cDNA 進行 PCR 確認。

## 9. 統計分析

所有的統計結果皆使用 Sigma Plot 軟體進行分析，數據間的差異性是否顯著是利用 *t*-test 來計算，以 *p* value 是否小於 0.05 做為判定。\**p* < 0.05；\*\**p* < 0.01；\*\*\**p* < 0.001；Non-significant (NS)：*p* > 0.05。

## 結果與討論

### 1. myoD 蛋白穩定性在 MBNL1 knockdown 細胞中並無改變

我們使用 cyclohexamide 抑制新的蛋白合成，發現在對照組(shRFP)和 knockdown Mbnl1 的細胞株中(shMBNL634)，MyoD 蛋白穩定性沒有顯著差異(Fig 1B)，但是 MyoD 蛋白在 shMBNL634 的細胞中一開始就有比對照組明顯降低的現象(Fig 1A)。因此，Mbnl1 knockdown 並不會造成 MyoD 蛋白的不穩定，推測 MyoD 蛋白的減少應在轉譯前的調控。

### 2. myoD 3'UTR 序列可能受 miRNA 調控

將 pGL3 control、pGL3 control-myoD 3'UTR FL、myoD 3'UTR 的各個不同片段(Fig. 2A)transfect 至 C2C12 或 HeLa 中，可看出有 transfect myoD 3'UTR FL 的細胞不論在 C2C12(Fig. 2B)或 HeLa(Fig. 2C)中相較於 control 組，luciferase 活性皆有顯著下降。而在 D2 luciferase 活性有回復，D4 則只在 HeLa 細胞中活性有回復。這表示 myoD 3'UTR 序列可能受 miRNA 調控，而 miRNA 結合的位置可能不在 D2。D4 的序列可能受 muscle-specific miRNA 所調控。

### 3. miR-682 會調控 MyoD 的 3'-UTR

利用 microRNA.org、Microcosm Targets、TargetScan Human 3 種生資網站預測出有可能會結合至 MyoD 3'UTR 的 miRNA，其中有 4 個 miRNA 重複被預測到，分別為 miR759、miR339-3p、miR682 和 miR762。透過 q-PCR 偵測這些 miRNA 在 C2C12、HeLa、ATDC5 細胞中的表現量，發現 miR-759、miR-339-3p 在 C2C12 細胞中表現不多，miR-682、miR-762 在 C2C12 細胞中則是有表現(Fig. 3)。再進一步看 miR-682、miR-762 與 Myo D 之間的關係，發現 miR-682 表現在分化後下降，而在 MBNL1 knock down 後有顯著上升(Fig. 4)，顯示 miR-682 與 myoD 的表現呈消長關係；而 miR-762 表現情形則相反，沒有與 myoD 的表現呈消長關係(Fig. 4)。miR-682 在 MyoD 3'UTR 上預測的結合位置有二個，分別是 1-14 以及 256-277，其中 1-14 的位置不是 MyoD 3'UTR 被調控的活性區，因此我們製備將 255-277 的位置去除的 clone (F2A – D5)，發現 transfect 至 C2C12 細胞中後 luciferase 活性有回復，顯示 miR-682 可能調控 MyoD 3'UTR(Fig. 5)。

#### 4. 分析 C2C12-(CUG)200 重複序列細胞 NGS 的結果

我們收集 C2C12-(CUG)200 細胞與對照組細胞兩時期的樣品，分別為分化前與分化第三天，進行小分子 RNA NGS 的分析，偵測 miRNA 在 C2C12-(CUG)200 細胞分化的過程中表現量的改變。我們的 NGS 分析定序量大約為 5M Reads，機型則為 Illumina 的 GAIIx 和 NextSeq500，定序後利用 miRDeep2 比對 miRNA 的資訊，使用的資料庫版本為 miRBase19。從 miRNA 的散佈圖中可以看到在分化後含有重複序列的細胞與對照組相比大多聚集在中線的位置，只有特定部分的 miRNA 有偏離中線的情況，顯示的確有部分的 miRNA 發生失調的現象(Fig. 6)。我們接著再進一步分析 NGS 的結果。在分化前的樣品中共有 1061 個 miRNA 被偵測到，在 CUG200 細胞 up-regulation 的部分，改變量大於兩倍以上的占了 12.73%，其中大於五倍以上的占了 3.29%；down-regulation 的部分，改變量大於兩倍以上的占了 26.75%，其中大於五倍以上的占了 10.73%。分化後共有 975 個 miRNA 被偵測到，在 CUG200 細胞 up-regulation 的部分，改變量大於兩倍以上的占了 15.67%，其中大於五倍以上的占了 11.44%；而 down-regulation 的部分，改變量大於兩倍以上的占了 29.62%，其中大於五倍以上的占了 20.69% (錯誤! 找不到參照來源)。

#### 5. 挑選候選 miRNA

NGS 是種高通量的實驗方法，為避免之後實驗數據結果過於偏頗，我們先將 NGS 結果中 reading counts 小於 100 的 miRNA 剔除，留下較可信的 miRNA 數據，再將 CUG200 分化後分化前的改變量與對照組做比較，即  $(\text{CUG200 DM3}/\text{CUG200 GM}) / (\text{N3 DM3}/\text{N3 GM}) = \text{Fold change}$ 。利用此公式檢視失調的 miRNA，數值如果  $\geq 1.5$ ，我們將它歸類於上調； $\leq 0.5$ ，則為下調。將 Fold change 繪製成圓餅分布圖後，可發現有 44% 的 miRNA 符合我們的篩選條件(Fig 8 A)。接著，利用數據初步分析 miRNA 的表現情形後，我們比對篩選在老鼠以及人類中序列具有高保留度(Highly conserved)的 miRNA，並搜尋文獻找出可能參與調控我們預期的生物功能的 miRNA。從文獻搜尋的 miRNA 大致上分為三類，第一，在 DM1 疾病的相關文獻中提到病人檢體內有差異的 miRNA，病人檢體不限來自哪種組織，共有 49 個 miRNA(錯誤! 找不到參照來源。)，第二，有關成肌作用或骨骼肌發育相關的文獻中提到的 miRNA，第三，因為很多文獻指出 miRNA 會透過調控細胞週期而影響肌肉分化，因此我們也將參與細胞週期調控的 miRNA 納入(Fig 8 B)。只要 miRNA 符合其中一項，我們便將它列為可能的目標。經過篩選後，我們挑出 18 個候選 miRNA，其中有 13 個屬於上調，分別為：miR-1a-3p、miR-22-5p、miR-26a-5p、miR-99a-5p、miR-99a-3p、miR-100-5p、miR-132-3p、miR-133b-3p、miR-195a-5p、miR-199b-5p、miR-218-5p、miR-331-3p、miR-497-5p；5 個屬於下調，分別為：miR-10a-3p、miR-10b-5p、miR-92a-3p、miR-92b-3p、miR-486-3p (0)。

## 6. 驗證 NGS 的結果

為了確認 NGS 所偵測到 miRNA 的表現量，我們將候選 miRNA 去進行 Real Time quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) 的實驗。判別這些 miRNA 的表現情況有無符合 NGS 趨勢，改變量 $\geq 1.5$  或 $\leq 0.5$  且具統計意義。一共有 11 個 miRNA 符合 NGS 趨勢，其中只有 3 個 miRNA 是完全符合我們預期的，分別為 mmu-miR-22-5p (fold change = 1.72)、mmu-miR-199b-5p (fold change = 3.40)、mmu-miR-218-5p (fold change = 2.09)；有 4 個改變有達到標準但沒有顯著差異，分別為 mmu-miR-10a-3p、mmu-miR-99a-3p、mmu-miR-195a-5p、mmu-miR-497-5p；有 4 個改變量未達標準分別為 mmu-miR-26a-5p、mmu-miR-92a-3p、mmu-miR-132-3p、mmu-miR-486-3p (Fig. 9)。

## 7. 利用生物資訊網站預測候選 miRNA 的目標基因和功能性分析

我們將 mmu-miR-22-5p、mmu-miR-199b-5p、mmu-miR-218-5p 三個 miRNA，利用生物資訊網站預測其目標基因並做功能性分析。三個生資網站分別為 MICROT-CDS、Targetscan-mus、miRDB，將 MICROT-CDS 的 miTG score 設為大於 0.7，再與 Targetscan-mus 或 miRDB 做交集比對，Targetscan-mus 的 Aggregate PCT 設為大於 0.7，miRDB 的 Target Score 設為大於 60，預測出來的目標基因約有五百多個。此外，我們也利用 David 網站分析這些基因會參與那些 biological process (Gene Ontology analysis)，以及分析這些基因所參與的 KEGG 生物途徑 (KEGG pathway)，從 GO 的分群結果以及 KEGG 途徑中發現，這些基因參與調控肌肉分化(錯誤! 找不到參照來源。)，且 p value 皆有意義。我們從這些基因中挑出了與肌肉相關的基因如錯誤! 找不到參照來源。。由於此三個 miRNA 在分化後的表現量是上調的，因此我們推測它的目標基因可能是抑制分化，或是促進增生、死亡的基因，例如 Mef2c、Myf5、Shh、Sox6、Pax3、Mbnl1、Six4、mTOR 等的基因。

## 8. 過表現 miRNAs 和 miR-218 使細胞分化受阻

將 precursor miRNA 的序列接進入 pEGFP-N3 的載體中，將製備好的 miRNA 過度表現載體轉染送進 C2C12 細胞中，觀察 C2C12 細胞分化前與分化後第三天分化的能力，分別發現 miR-22, miR-29C, miR-100 在分化後第三天螢光圖 (EGFP) 中 myotube 的形成能力明顯的降低(Fig. 10)。另外，在 NGS 的結果中發現 miR-218 有失調的現象，miR-218 現稱 miR-218-5p，它在人類和老鼠中為高保留度的序列，在染色體上分別坐落在染色體 5 號 Slit2 基因和染色體 11 號 Slit3 基因的 intron 中，並且命名為 pre-miR-218-1 和 pre-miR-218-2。利用 microRNA.org 預測它可能的目標基因，結果顯示 miR218 可能為調控 MyoD 這個參與肌肉細胞分化的重要基因。在 CUG200 的細胞分化第三天時，MyoD 蛋白質的表現為下降(Fig 11A)，顯示 miR-218 與 myoD 有消長的趨勢，推測 miR-218

可能調控 myoD 基因之表現。

由於 MyoD 3'-UTR 上也包含了 miR-218-2-3p 的結合位，為了探討 miR218 是否調控 myoD 3'-UTR，我們製作 pre-miR-218-1 的 clone，將含有 pre-mir-218-1 的序列接到 pCS2+表現載體上，並將其轉染至 C2C12 細胞中，隔天收取 RNA 和蛋白質，miR-218-5p 表現量增加了約  $11 \pm 0.7$  倍(Fig 11B)，利用 Q-PCR 和西方點墨法，發現在過度表現 miR-218 之後，MyoD 的 mRNA 下降了 40%，蛋白表現下降了 30%( Fig 11 CD)，此結果顯示 MyoD 的表現可能受 miR-218 調控。

將 pre-miR-218-1 接到 pEGFP-N3 質體中的 EGFP 序列前，由於 miRNA 生成後會將其它部分的序列去除，導致螢光變弱，因此可以透過觀察螢光亮度來判定 miRNA 有無表現。我們將 pEGFP-N3- pre-miR-218-1 與綠螢光空質體分別轉染至 C2C12 細胞中，利用 500 $\mu$ g/ml G418 篩選一星期後，將細胞誘導分化至第 5 天觀察細胞型態，發現過度表現 miR-218 的細胞其分化的能力減弱，形成的 myotube 變細(Fig 12)，顯示 miR-218 會抑制細胞分化。

為探討 miR-218 是否透過結合到 3'-UTR 上進行調控，我們建立 pGL3-control-MyoD 3'-UTR -Full Length(pGL3-control-MyoD 3'-UTR -FL)的冷光報導質體，將預測到的 miR-218 結合位(Fig 13A)刪除(pGL3-control-MyoD 3'-UTR -Del331-336) (Fig 13B)。將含有 MyoD 3'-UTR 的質體與 pCS2+或 pCS2+-miR-218-1 一起轉染至 HEK-293T 細胞中，偵測其冷光表現，結果發現 miR-218 抑制 MyoD 3'-UTR 的冷光活性 30% (Fig 13C)。將 pGL3-control、MyoD 3'-UTR -FL、Del 331-336 的質體分別轉染至 C2C12 細胞中，結果去除 miR-218 結合位的冷光表現相較於 control，從原本 FL 的 40%回復到約 60% (Fig 13D)。另外，我們又將 Deletion 331-336 的冷光報導質體與 pCS2+或 pCS2+-pre-miR-218-1 一起轉染至 C2C12 細胞中，結果顯示 miR-218 不會抑制此序列活性(Fig 13E)，表示 miR-218 可能的調控區域為 myoD 3'-UTR 331-336 之間。由以上的實驗結果得知，miR-218 可透過調控 MyoD 基因的 3'-UTR 進而調控 MyoD 的 RNA 和蛋白質表現。

## 9. NGS 結果結合生資預測及 qRT-PCR 與 dual-luciferase reporter assay 找出可能調控 MyoD 3'UTR 的 miRNA

在 NGS 結果中選出 miRNA 在 CUG repeat 細胞中是 upregulation，並與 TargetScane、Human miRNA Target 預測 miRNA 會影響 MyoD 3'UTR 的結果進行交集，發現 19 個可能的 miRNA，最後選出 12 個高度保留的 miRNA (miR-221, miR-34a, miR-760, miR-335, miR-27a, miR-193a, miR-30c, miR-296, miR-339, miR-34a, miR-24, miR-409 ) (Fig. 14)

進一步利用 qRT-PCR 偵測 miRNA 表現量並分析 dual-luciferase reporter 的活性探討會影響 MyoD 3'UTR 的 miRNA。qRT-PCR 的結果顯示 miR-193a 在 CUG200 的細胞中表現量有上升的現象(Fig. 15A)。將 miR-193a 和 MyoD 3'UTR full length 一起送至 HEK-293T，分析 luciferase 的活性有明顯下降(Fig. 15B)。利用生物資

訊預測網站預測 miR-193a 可能會結合至 MyoD 3' UTR 253-258，發現 MyoD 3' UTR 255-277 包含了一部份的 miR-193a seed region，而將去除 MyoD 3' UTR 255-277 的質體送至 C2C12 當中，分析 luciferase 的活性，發現相較於 MyoD 3' UTR full length 有明顯的回復現象，因此我們推測此區域可能是受到 miR-193a 的調控。在 C2C12 當中過量表現 miR-193a，我們發現 MyoD 蛋白質的表現量會下降(Fig 16)。綜合以上結果，miR-193a 在 C2C12-(CUG)200 的細胞當中的表現上升，且可能透過調控 MyoD 3'UTR 抑制 MyoD 蛋白的表現，進一步抑制細胞分化。

## 10. 其他 miRNA 調控的候選基因的表現

除了 MyoD 基因以外，我們以生資軟體預測可能受 miR-22-5p、iR-199-5p、miR-218-5p 所調控的候選基因(表四)，包括 Mef2c (myocyte-specific enhancer factor 2C)、Myf5 (myogenic factor 5)、mTOR(mechanistic target of rapamycin)Gata4 (GATA binding protein 4)、Nfatc3 (nuclear factor of activated T-cell 3)、Six4 (SIX homeobox 4)Ski (SKI protooncogene)，文獻指出在分化時這些基因的表現都會增加。我們檢查這些基因再對照組及 CUG200 細胞分化前後的表現，發現在分化後 p-mTOR 的蛋白質表現下降了 30% (mTOR 不變)(Fig 17)，Six4 與對照組相似，其他 Nfatc3、Ski、Myf5、Gata4、Mef2c 的基因表現都有失調的現象，特別是 Mef2c 在對照組細胞分化時會大量表現，但在 CUG200 細胞中則無此現象(Fig 17)。

## 11. 製作 DM1 病患的不朽化 myoblast 細胞株

為了在人類細胞中進一步驗證我們的實驗結果，我們從美國 Coriell Institute for Medical Research 公司購買了人類 DM1 病人的初代纖維母細胞(Primary human DM1 fibroblast cells)，編號為 GM07492、GM03987、GM04033、GM03989，長度分別為 CTG 重複 5 次的對照組、重覆 500、1000、2000 次的病患細胞。我們先將其不朽化(immortalized)，使用 Human telomerase reverse transcriptase(hTERT)使細胞的端粒不會隨著細胞複製而縮短。我們先將 pLOX-TRET-iresTK 製作病毒液，感染完細胞後利用 0.6 µg/ml puromycin 篩選一週，觀察細胞型態(Fig 18 A)並利用 PCR 確認細胞染色體中的確有被插入 hTERT 基因(Fig 18 B)。

為使纖維細胞轉為類似於肌纖維母細胞(myoblast)的細胞特性，我們將 MyoD 的序列接到 p3xFlag 表現載體中，並將其感染不朽化後的纖維母細胞。我們先用初代纖維母細胞，測試 p3xFlag-human MyoD 的質體是否能製造 MyoD 蛋白質並誘使細胞分化，我們在轉染帶有 MyoD 質體後的第二天，進行西方點墨法確認 flag 有表現，由於 MyoD 和 flag 為融合蛋白(fusion protein)，可藉由偵測其表現來證明 MyoD 是外來的(Fig 19 A)，並利用免疫螢光染色確認 MyoD 有表現(Fig 19 B)。未來將使用此細胞株作為 DM1 疾病肌母細胞進一步驗證。

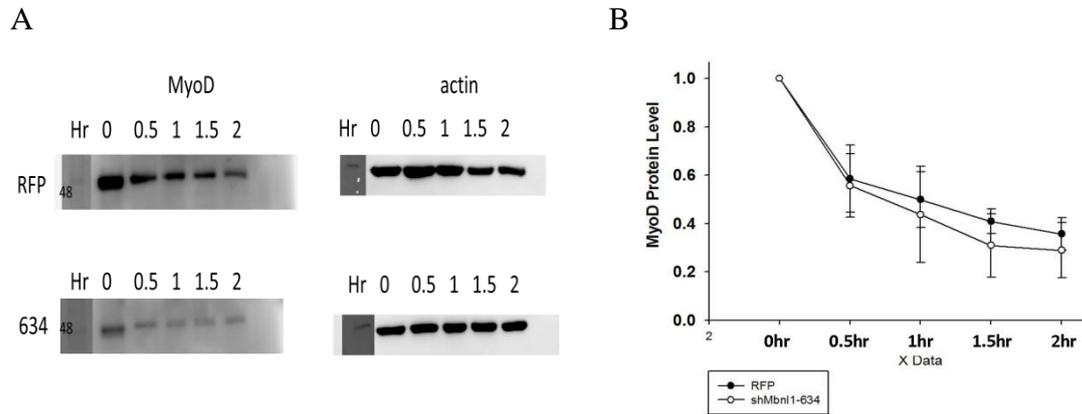


Fig. 1 myoD 蛋白穩定性在 MBNL1 knockdown 細胞中並無改變

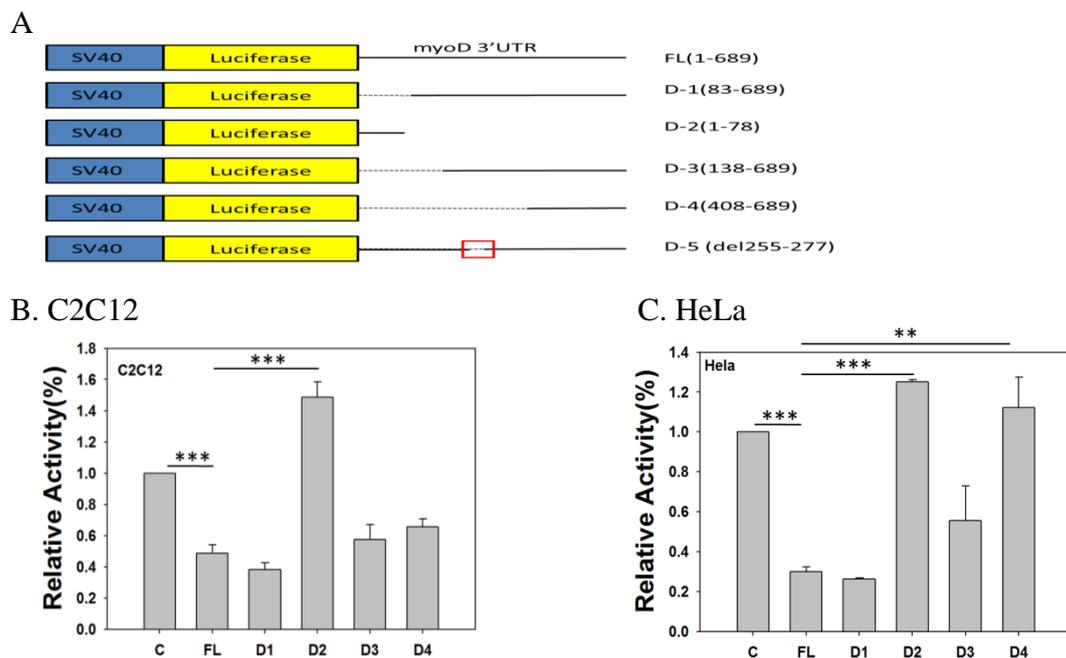


Fig. 2 myoD 3'UTR 的活性。(A) myoD 3'UTR 的不同片段所製備的 luciferase 質體，control 為不含 myoD 3'UTR, (B)C2C12, (C) HeLa 結果為三次獨立的實驗平均。\*\*\*表示  $P < 0.001$ ，\*\*表示  $P < 0.01$ 。

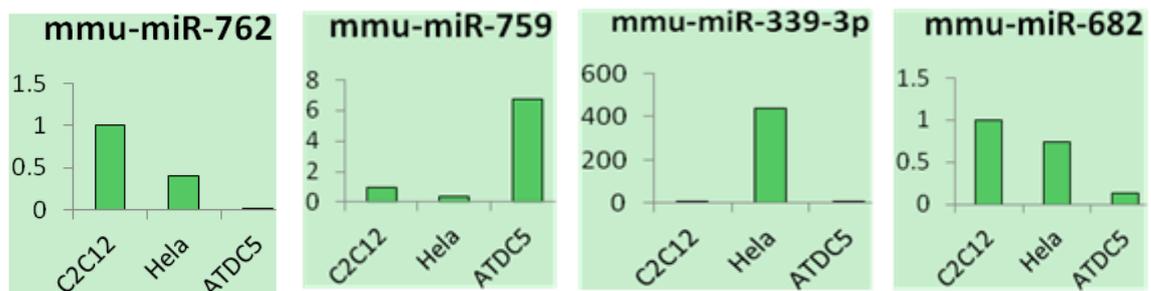


Fig. 3 qPCR 偵測在 C2C12、HeLa、ATDC5 細胞中 microRNA 的表現量

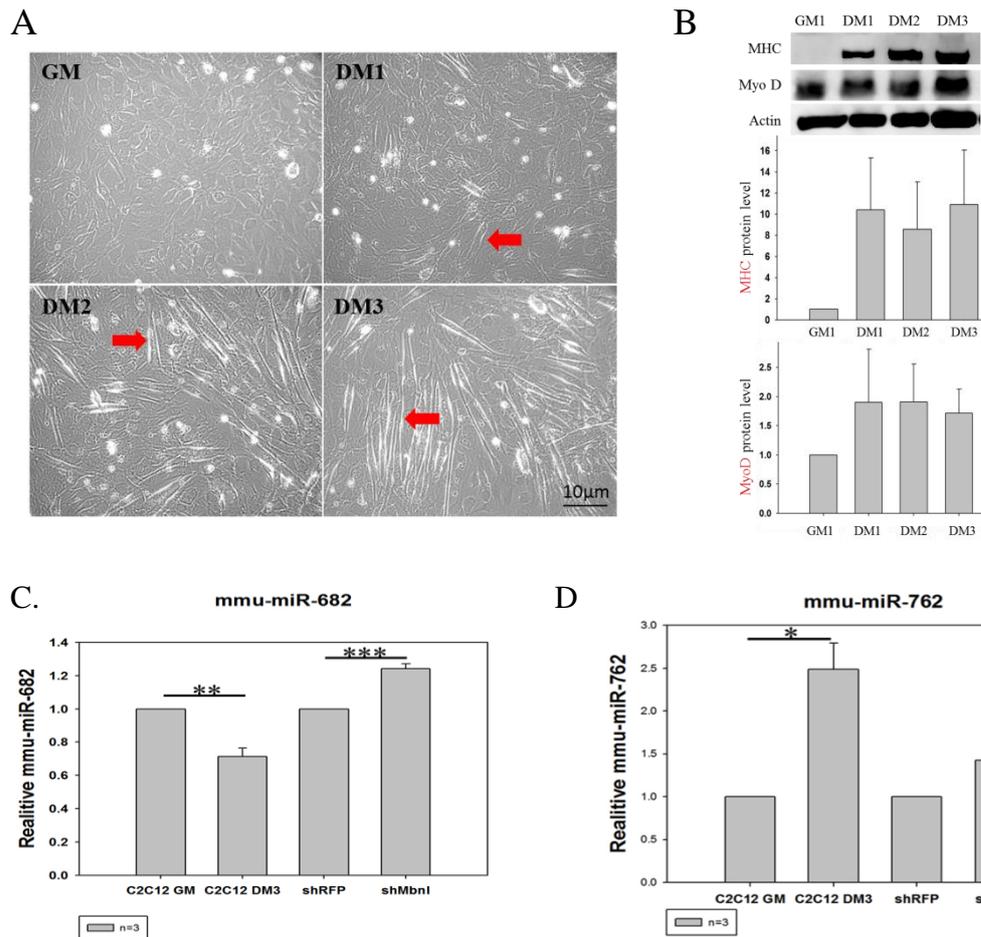


Fig. 4 (A)C2C12 細胞在分化前、分化第一、二、三天時的細胞型態，箭頭處為 myotube，(B)MyoD 和 MHC 的表現情況。qPCR 偵測(C)miR-682 (D)miR-762 在 MyoD 上升和下降時的表現情形。結果為三次獨立的實驗平均。\*\*\*表示  $P < 0.001$ ，\*\*表示  $P < 0.01$ ，\*表示  $P < 0.05$ 。

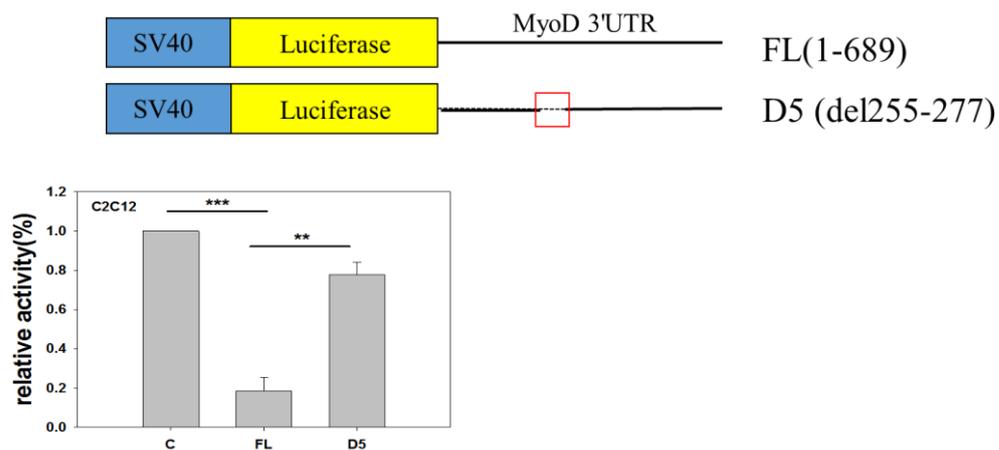


Fig. 5 將 mmu-miR-682 的預測 binding site 去除後(D5)，luciferase 活性有回復。

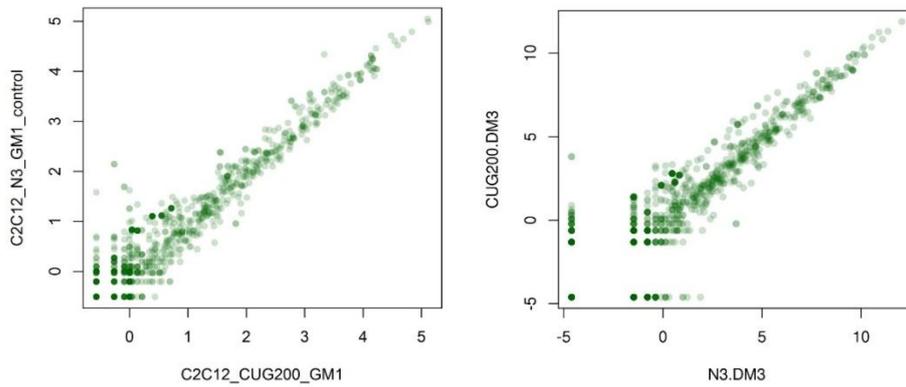


Fig. 6 miRNA 表現量的數據散佈圖。(A)萃取分化前控制組及 C2C12-(CUG)200 細胞，(B) 萃取分化後第三天控制組及 C2C12-(CUG)200 細胞進行 *Next Generation Sequencing* (NGS) 的分析，偵測 miRNA 在細胞中的表現量。

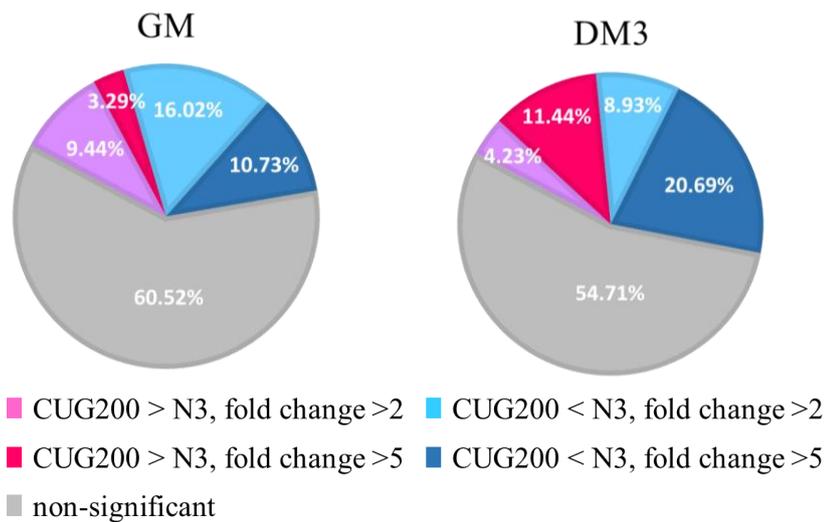
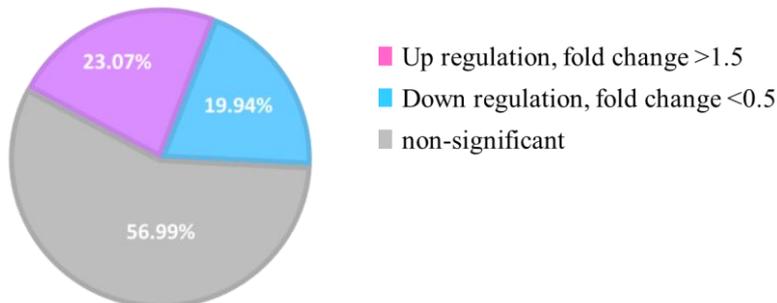


Fig. 7、GM 為分化前 DM3 為分化後(CUG)200 細胞與對照組比較差異後的百分比圓餅圖

A

FOLD CHANGE



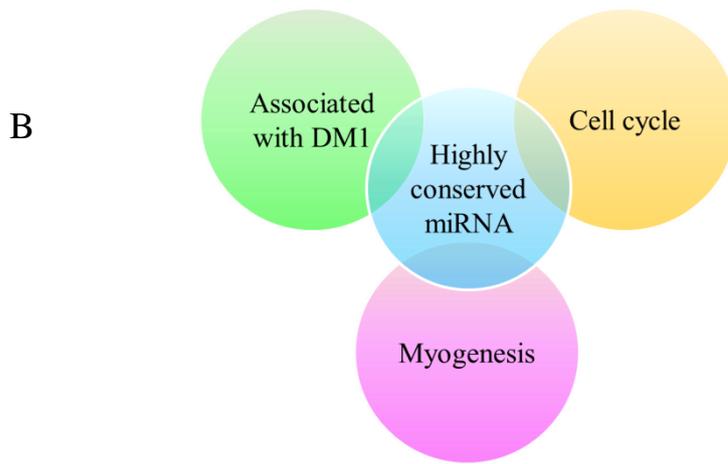


Fig. 8 篩挑選候選 miRNA 的流程

(A) fold change 的百分比圓餅 (B)挑選時所參考條件示意圖

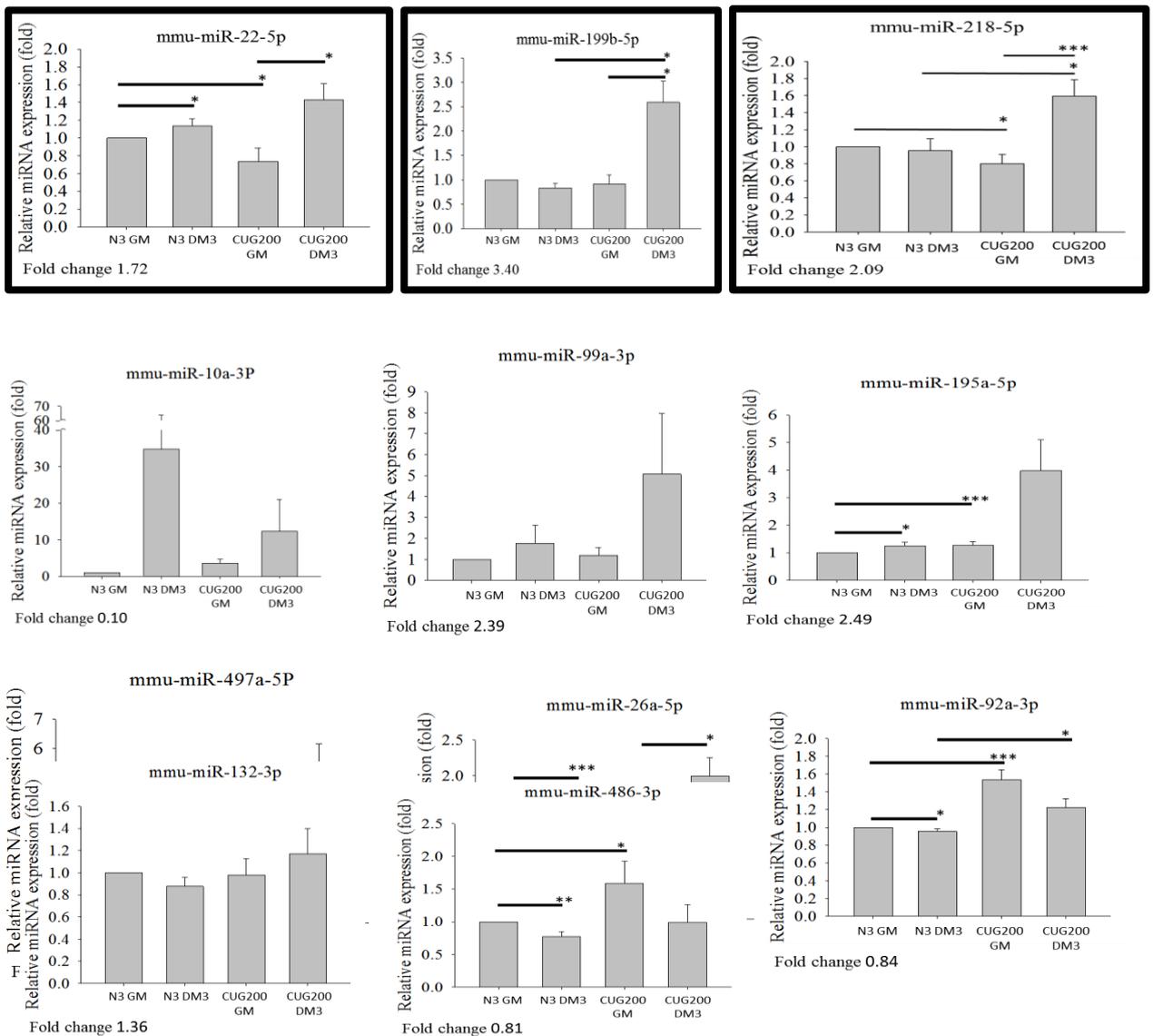


Fig. 9 利用 qRT-PCR 偵測 mature miRNA 表現量。挑選出來的 miRNA 經由 q-PCR 驗證 mmu-miR-22-5p、mmu-miR-199b-5p、mmu-miR-218-5p，此三個 miRNA 的 fold change 皆大於 1.5 且有顯著差異；miR-10a-3p、miR-99a-3p、miR-195a-5p、miR-497-5p，此四個 miRNA 的 fold change 雖達到標準但無顯著差異。miR-26a-5p、miR-92a-3p、miR-132-3p、miR-486-3p，此四個 miRNA 的 fold change 沒有達到標準。結果為三次獨立的實驗平均，以 U6 作為 internal control，\*\*\*表示  $P < 0.001$ ；\*\*表示  $P < 0.01$ ；\*表示  $P < 0.05$ 。

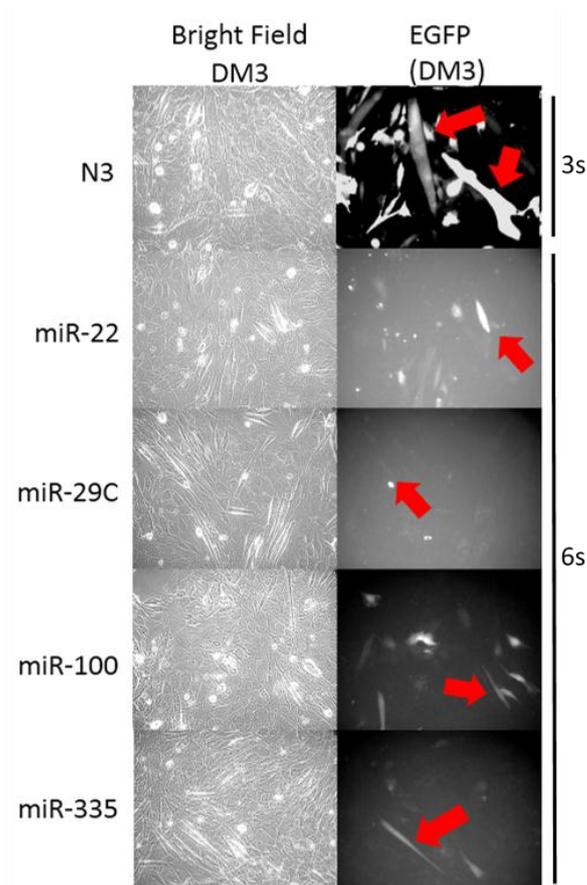


Fig. 10 過度表現 miRNA 抑制細胞分化能力。轉染過度表現的 miRNA 進入 C2C12 細胞中，在分化第三天發現 miR-22, miR-29C, miR-100 在分化後第三天螢光圖(EGFP) 中 myo-tube 的形成能力明顯的降低。3s:螢光曝光 3 秒，6s:螢光曝光 6 秒。

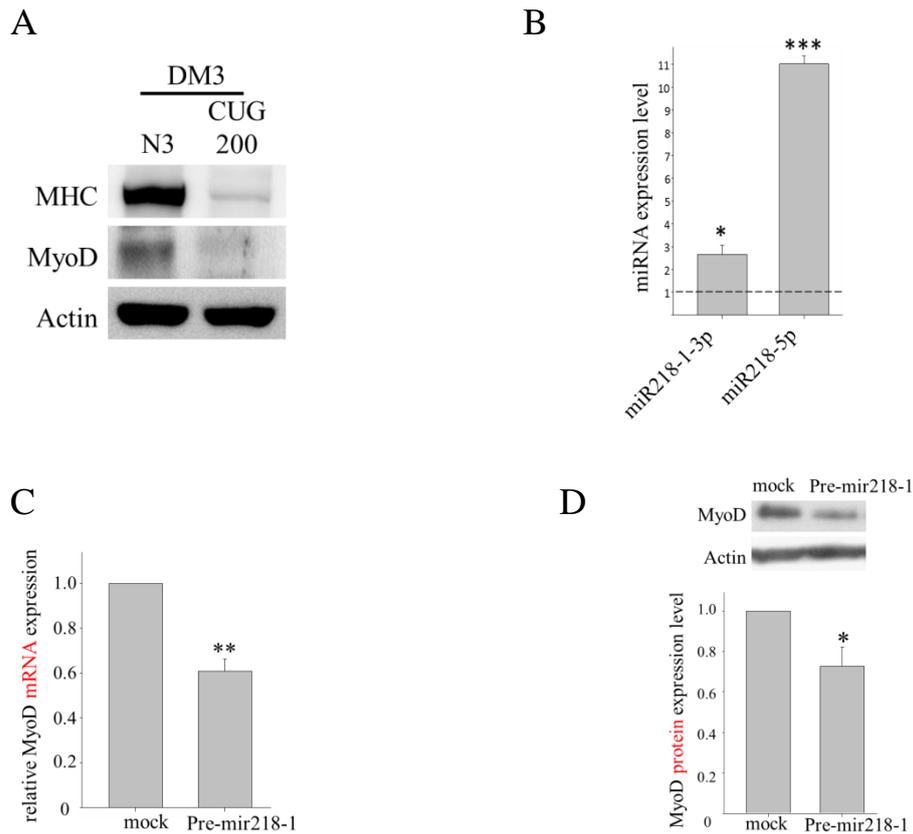


Fig. 11 miR-218 會影響 MyoD 的 RNA 和蛋白表現

(A)(CUG)200 細胞分化第三天時，MyoD 蛋白的表現比對照組少。(B)在 C2C12 細胞中分別轉染 PCS2+質體或 PCS2+mmu-pre-mir-218-1 後，隔天收 RNA 樣品，利用 Q-PCR 偵測 miR-218-5p 和 miR-218-1-3p 的表現情況。(C)過度表現 miR-218-5p 後，利用 Q-PCR 偵測 MyoD 的 RNA 表現量。(D)過度表現 miR-218-5p 後，利用西方點墨法偵測 MyoD 的蛋白表現量。結果為三次獨立的實驗平均，Q-PCR 以 U6 和 GAPDH 作為 internal control，西方點墨法中以 Actin 作為 internal control。\*\*\*表示  $P < 0.001$ ，\*\*表示  $P < 0.01$ ，\*表示  $P < 0.05$ 。

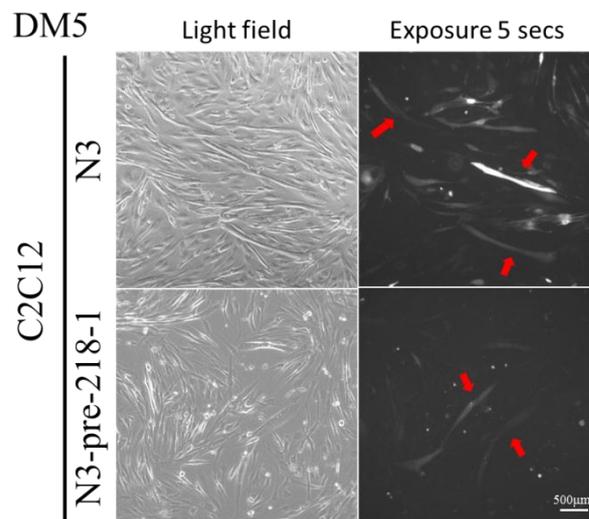


Fig. 12 miR-218 抑制細胞分化

將 pEGFP-N3- pre-miR-218-1 與綠螢光空質體分別轉染至 C2C12 細胞中，利用 G418 篩選一星期後，將細胞誘導分化至第 5 天觀察細胞型態，箭頭處為 myotube。

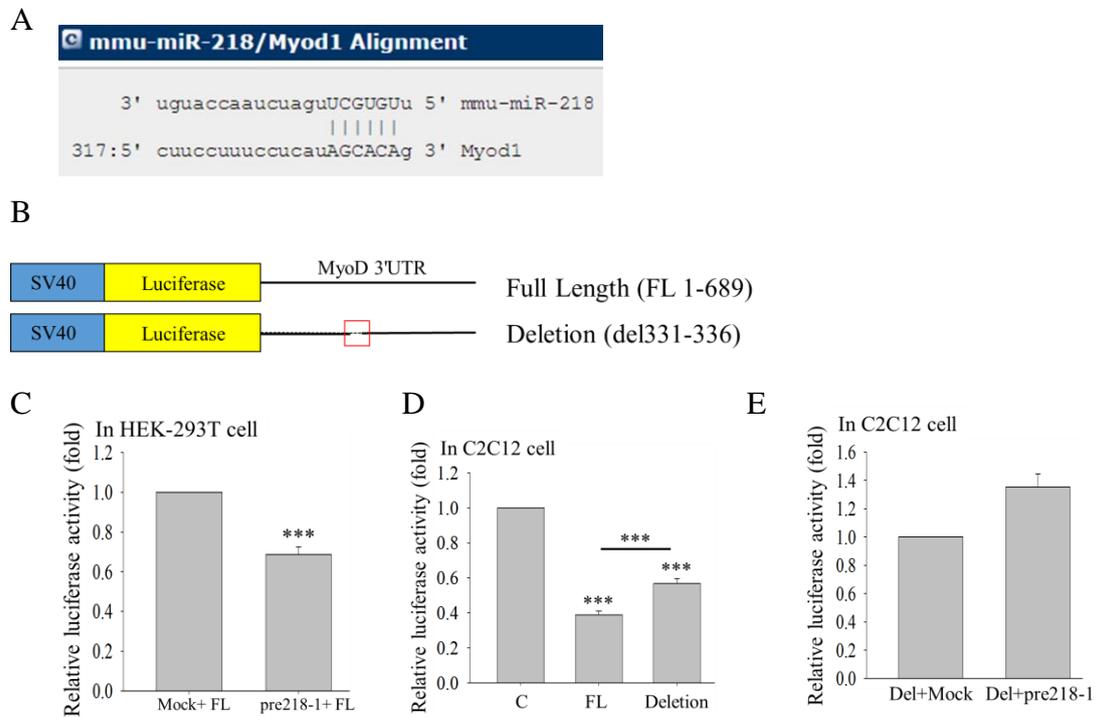


Fig 13 miR-218 透過結合至 MyoD 3'-UTR 調控 myoD 的表現

(A)利用 microRNA.org 網站預測到的 miR-218 結合位(B) MyoD 3'-UTR -Full Length 和 Deletion 的示意圖(C)將 MyoD 3'-UTR 的冷光報導質體與 PCS2+或 PCS2+-miR-218-1 一起轉染至 HEK-293T 細胞中，隔天偵測其冷光表現。(D)將 PGL3-control、MyoD 3'-UTR -FL、Deletion 331-336 的質體分別轉染至 C2C12 細胞中，偵測其冷光表現。(E)將 Deletion 331-336 的冷光報導質體與 PCS2+或 PCS2+-pre-miR-218-1 一起轉染至 C2C12 細胞中，偵測其冷光表現。

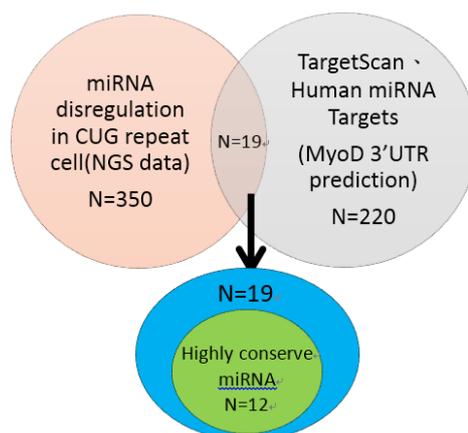


Fig. 14 在 NGS data 當中選出 miRNA 在 CUG repeat 細胞中是 upregulation，並與 TargetScane、Human miRNA Target 預測 miRNA 會影響 MyoD 3'UTR 的結果進行交集，發現 19 個可能的 miRNA，最後選出 12 個高度保留的 miRNA

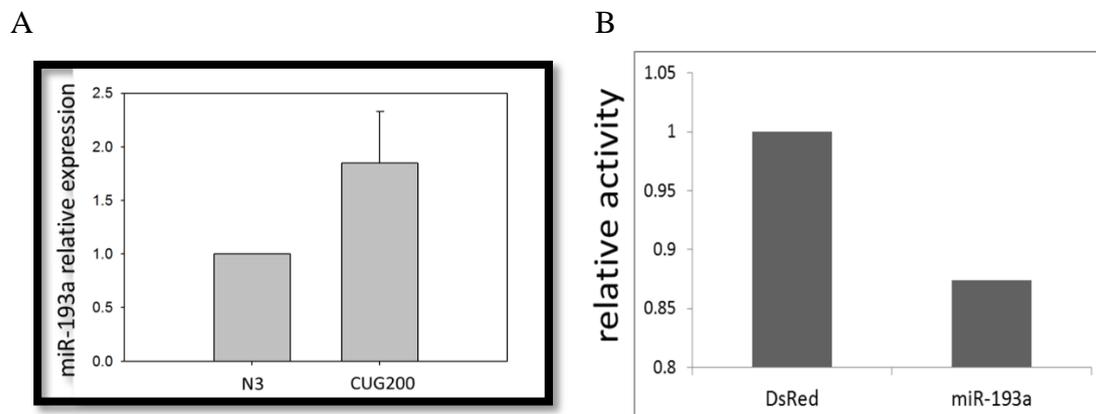


Fig. 15 (A)利用 qRT-PCR 分析 miR-193a 在 CUG200 細胞中的表現量，結果顯示相較於 CUG0 細胞，miR-193a 的表現多出 2 倍(B)將 pCS2+-DsRed -pre-miR193a 和 MyoD 3'UTR full length 一起轉染至 HEK-293T 中，並分析 luciferase 活性，結果顯示 miR193a 會影響 MyoD 3'UTR。

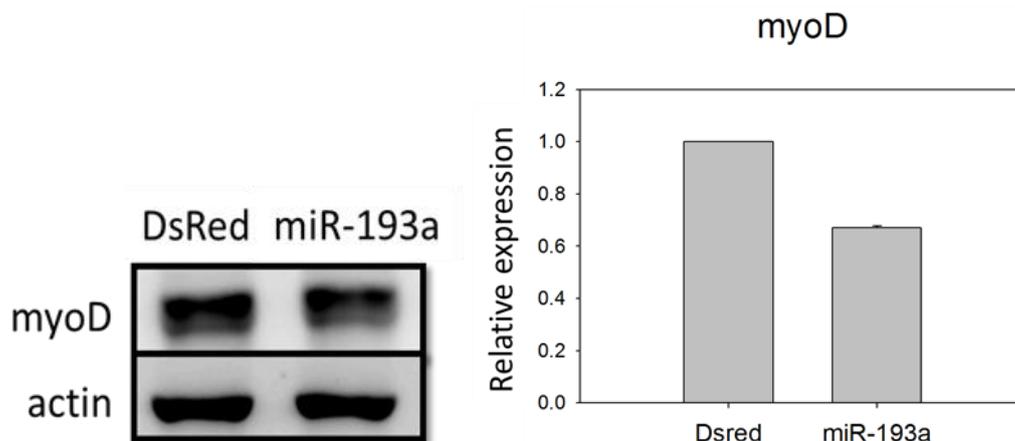
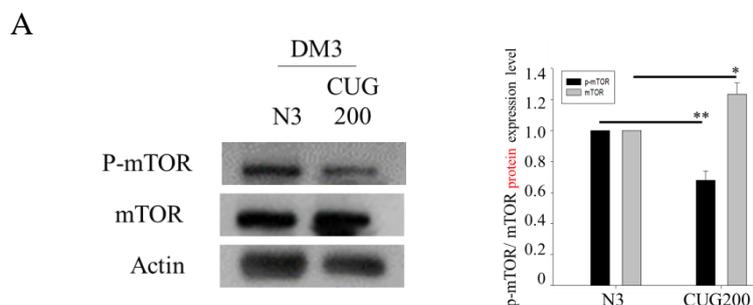


Fig. 16 在 C2C12 當中過量表現 miR-193a，接著利用西方點墨法偵測 MyoD，定量後的結果顯示 MyoD 的表現量下降。



B

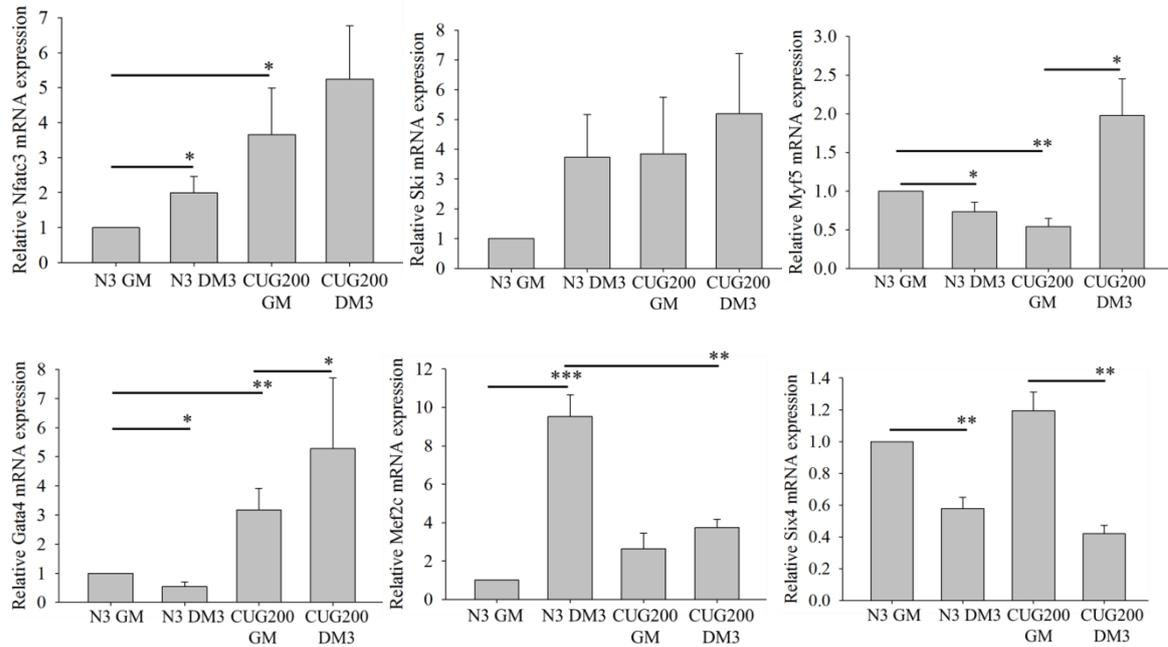
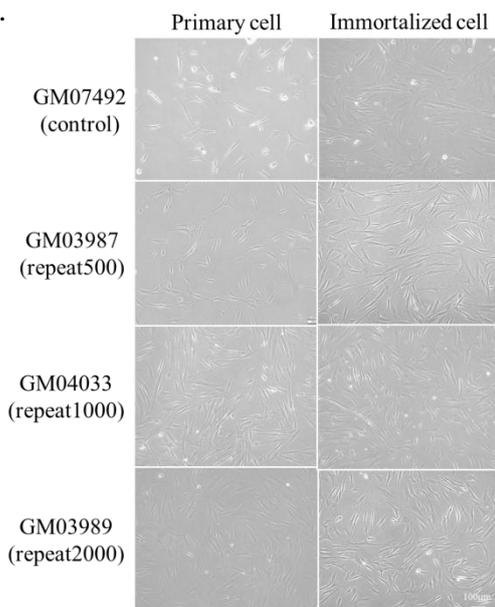


Fig 17、候選基因在(CUG) 200 細胞分化過程中 RNA 或蛋白表現

(A)利用西方點墨法偵測分化第三天時，p-mTOR 和 mTOR 的蛋白表現。(B)利用 Q-PCR 偵測對照組以及(CUG) 200 細胞分化前與分化第三天，Nfatc3、Ski、Myf5、Gata4、Mef2c、Six4 RNA 表現情形。結果為三次獨立的實驗平均，西方點墨法中以 Actin 作為 internal control，Q-PCR 以 GAPDH 作為 internal control。\*\*\*表示  $P < 0.001$ ，\*\*表示  $P < 0.01$ ，\*表示  $P < 0.05$ 。

A.



B.

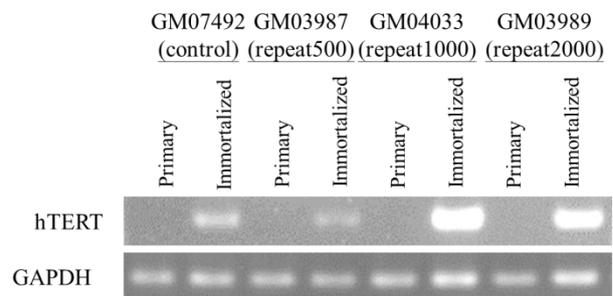
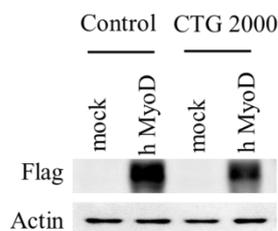


Fig 18、製作不朽化的 DM1 病人纖維母細胞

(A)不朽化後的 DM1 病人纖維母細胞和初代時的細胞型態 (B) PCR 確認細胞染色體中的確有被插入 hTERT 基因，以 GAPDH 為 PCR 的 internal control。

A



B

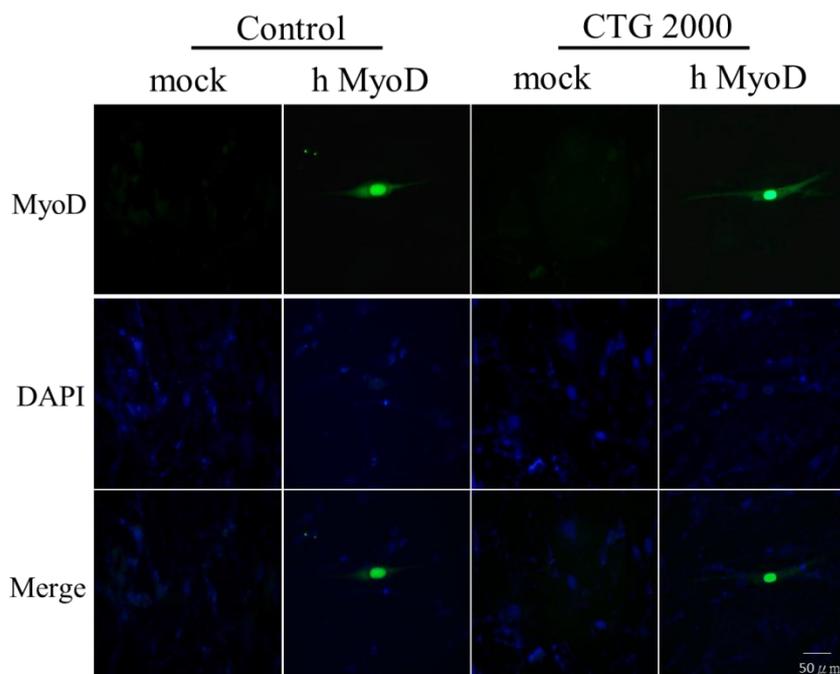


Fig 19、使纖維細胞表現 MyoD 而轉為 myoblast 細胞

(A)利用西方點墨法確認 flag 蛋白有表現，以 Actin 為 PCR 的 internal control。(B)利用免疫螢光染色確認 MyoD 有表現(綠螢光)，藍螢光的部分為 DAPI。

表一、DM1 病人檢體中有差異的 miRNA 統計表格

截至 2014 年 11 月，DM1 疾病的相關文獻中，利用病人檢體(不限組織)檢驗哪些 miRNA 有差異的統計結果，圖示↑、=、↓分別表示 miRNA 在病人檢體中為上升、不變、下降，共有 49 個 miRNA。

	Expression in DM1	Method	References
<b>miR-1</b>	↑↓=	qPCR	Yasunari Matsuzaka et al., 2014 Juan M. Fernandez-Costa et al., 2013 Auinash Kalsotra et al., 2014 Stefano Gambardella et., 2010 Riccardo Perbellini et al., 2010 Riccardo Perbellini et al., 2010
<b>miR-133a</b>	↑↓=	qPCR	Yasunari Matsuzaka et al., 2014 Alessandra Perfetti et al., 2014 Auinash Kalsotra et al., 2014 Stefano Gambardella et., 2010
<b>miR-206</b>	↑ =	qPCR	Yasunari Matsuzaka et al., 2014 Stefano Gambardella et., 2010
<b>let-7b</b>	↑↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-29b</b>	↓	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014 Riccardo Perbellini et al., 2010
<b>miR-145</b>	↑↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-499</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-7</b>	↓	qPCR	Juan M. Fernandez-Costa et al., 2013
<b>let-7d</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>let-7g</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-9</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-10a</b>	↓	qPCR	Juan M. Fernandez-Costa et al., 2013
<b>miR-10b</b>	=	qPCR	Juan M. Fernandez-Costa et al., 2013
<b>miR-22</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-23a</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-23b</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-26a</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-27a</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-27b</b>	↓	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-29a</b>	=	qPCR	Riccardo Perbellini et al., 2010

<b>miR-29c</b>	↓	qPCR	Riccardo Perbellini et al., 2010
<b>miR-30b</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-33</b>	↓	qPCR	Riccardo Perbellini et al., 2010
<b>miR-100</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-103</b>	=	qPCR	Stefano Gambardella et., 2010
<b>miR-107</b>	=	qPCR	Stefano Gambardella et., 2010
<b>miR-125b</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-133b</b>	=	qPCR	Stefano Gambardella et., 2010
<b>miR-135a</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-140-3p</b>	↑	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-148a</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-181b</b>	=	qPCR	Stefano Gambardella et., 2010
<b>miR-181c</b>	=	qPCR	Stefano Gambardella et., 2010
<b>miR-191</b>	↑	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-193b</b>	↑	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-194</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-328</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-335</b>	↑	qPCR	Riccardo Perbellini et al., 2010
<b>miR-365</b>	↓	qPCR	Auinash Kalsotra et al., 2014
<b>miR-454</b>	↑	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-574</b>	↑	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-885-5p</b>	↑	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-886-3p</b>	↑	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-132</b>	↓	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-142-3p</b>	↓	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-215</b>	↓	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-218</b>	↓	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-221</b>	↓	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014
<b>miR-886-5p</b>	↑	qPCR	Alessandra Perfetti et al., 2014

**表 二、候選 miRNA 的 NGS 數據**

表列有 18 個候選 miRNA，其在對照組和(CUG)200 細胞中分化後分化前的變化量，以及(CUG)200 細胞與對照組變化量(Fold change)得比值，該值 $\geq 1.5$  歸於上調， $\leq 0.5$  則為下調。一共有 13 個屬於上調，5 個屬於下調。

miRNA	N3, DM3	CUG200, DM3	Fold change
	N3, GM	CUG200, GM	
mmu-miR-1a-3p	0.602696273	55.78181818	92.5537799
mmu-miR-199b-5p	1.441418294	7.652737752	5.309172073
mmu-miR-195a-5p	0.872810358	3.937797525	4.511630148
mmu-miR-133b-3p	0.840930345	2.900859816	3.449583943
mmu-miR-99a-5p	0.909209427	2.657501176	2.922870238
mmu-miR-331-3p	0.483668708	1.374101733	2.840997795
mmu-miR-132-3p	1.166296022	3.300312826	2.829738561
mmu-miR-497-5p	0.759664369	2.107957425	2.774853621
mmu-miR-22-5p	0.749125109	1.693711467	2.260919366
mmu-miR-100-5p	0.748251653	1.623867297	2.170215448
mmu-miR-26a-5p	0.964459069	1.90091354	1.970963414
mmu-miR-99a-3p	0.766377269	1.469745958	1.917783861
mmu-miR-218-5p	0.805783133	1.523301516	1.890460913
mmu-miR-486-3p	0.839717742	0.396377198	0.472036231
mmu-miR-92a-3p	0.617081087	0.283223336	0.458972641
mmu-miR-10a-3p	1.196948682	0.503649635	0.420777969
mmu-miR-10b-5p	0.190340909	0.055003427	0.288973228
mmu-miR-92b-3p	0.522367342	0.132529679	0.253709733

**表 三、目標基因的 GO 分群和 KEGG 生物途徑分析**

利用 MICROT-CDS (miTG score 大於 0.7)與 Targetscan-mus(Aggregate PCT 大於 0.7)預測 miR-22-5p、miR-199b-5p、miR-218-5p 的目標基因，在將結果交集比對，約有五百多個基因，在利用(A) GO 和(B) KEGG 網站進行分析。

A

GO Term	GO biological process complete	Fold Enrichment	P value
GO:2000637	positive regulation of gene silencing by miRNA	15.75	0.014113
GO:0035280	miRNA loading onto RISC involved in gene silencing by miRNA	15.75	0.014113
GO:0010586	miRNA metabolic process	13.78	0.018482
GO:0035278	negative regulation of translation involved in gene silencing by miRNA	11.31	0.004643
GO:0010656	negative regulation of muscle cell apoptotic process	11.02	0.028658
GO:0046426	negative regulation of JAK-STAT cascade	4.48	0.024615
GO:0035914	skeletal muscle cell differentiation	4.08	0.015335
GO:0045860	positive regulation of protein kinase activity	4.08	0.015335
GO:0008286	insulin receptor signaling pathway	3.75	0.043565
GO:0000209	protein polyubiquitination	3.67	0.001589
GO:0051865	protein autoubiquitination	3.67	0.046378
GO:0042787	protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	3.50	0.002229
GO:0017148	negative regulation of translation	3.20	0.039328
GO:0006470	protein dephosphorylation	3.11	0.001721
GO:0007179	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	3.06	0.045893
GO:0016311	dephosphorylation	2.83	0.009058
GO:0016567	protein ubiquitination	2.52	0.002710

<b>GO:0045944</b>	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2.13	0.000000
<b>GO:0046777</b>	protein autophosphorylation	2.11	0.048225
<b>GO:0000122</b>	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2.07	0.000024
<b>GO:0045892</b>	negative regulation of transcription, DNA-templated	1.99	0.001499
<b>GO:0006366</b>	transcription from RNA polymerase II promoter	1.99	0.031404
<b>GO:0045893</b>	positive regulation of transcription, DNA-templated	1.97	0.000689
<b>GO:0010468</b>	regulation of gene expression	1.97	0.021191
<b>GO:0006351</b>	transcription, DNA-templated	1.92	0.000000
<b>GO:0007275</b>	multicellular organismal development	1.86	0.000025
<b>GO:0006355</b>	regulation of transcription, DNA-templated	1.78	0.000000
<b>GO:0008284</b>	positive regulation of cell proliferation	1.71	0.022304
<b>GO:0030154</b>	cell differentiation	1.61	0.008350
<b>GO:0006468</b>	protein phosphorylation	1.58	0.028397

B

<b>KEGG ID</b>	<b>KEGG pathway</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>P value</b>
<b>mmu04310</b>	Wnt signaling pathway	1.9	0.00000015
<b>mmu04150</b>	mTOR signaling pathway	1.9	0.0023
<b>mmu04012</b>	ErbB signaling pathway	1.9	0.000072
<b>mmu04520</b>	Adherens junction	1.9	0.00012
<b>mmu04930</b>	Type II diabetes mellitus	1.9	0.0034
<b>mmu04910</b>	Insulin signaling pathway	1.8	0.0000016
<b>mmu04062</b>	Chemokine signaling pathway	1.7	0.000002
<b>mmu04340</b>	Hedgehog signaling pathway	1.7	0.012
<b>mmu04370</b>	VEGF signaling pathway	1.6	0.0074
<b>mmu04510</b>	Focal adhesion	1.6	0.000054
<b>mmu04010</b>	MAPK signaling pathway	1.5	0.000024
<b>mmu04810</b>	Regulation of actin cytoskeleton	1.5	0.00022

<b>mmu04144</b>	Endocytosis	1.5	0.00064
<b>mmu04514</b>	Cell adhesion molecules (CAMs)	1.5	0.0018
<b>mmu04630</b>	Jak-STAT signaling pathway	1.3	0.028

**表 四、候選肌肉分化相關的基因**

列表為 miR-22-5p、miR-199b-5p、miR-218-5p 的目標基因

<b>miRNA</b>	<b>Candidate Gene</b>
miR-22-5p	Gata4
miR-218-5p	Mef2c
miR-199b-5p	mTOR
miR-218-5p	Nfatc3
miR-199b-5p	Pax3
miR-22-5p	Shh
miR-218-5p	Six4
miR-218-5p	Ski
miR-218-5p	Sox6
miR-218-5p	Myf5
miR-218-5p	MyoD

## References:

1. Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., and et al. (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* **255**, 1253-1255
2. Hsiao, K. M., Chen, S. S., Li, S. Y., Chiang, S. Y., Lin, H. M., Pan, H., Huang, C. C., Kuo, H. C., Jou, S. B., Su, C. C., Ro, L. S., Liu, C. S., Lo, M. C., Chen, C. M., and Lin, C. C. (2003) Epidemiological and genetic studies of myotonic dystrophy type 1 in Taiwan. *Neuroepidemiology* **22**, 283-289
3. Ranum, L. P., and Day, J. W. (2004) Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* **74**, 793-804
4. Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., de Jong, P., and et al. (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**, 1256-1258
5. Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* **293**, 864-867
6. Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshire, M. G., Harper, P. S., and Brook, J. D. (2002) Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* **11**, 805-814
7. Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* **19**, 4439-4448
8. Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R. H. (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissue. *J. Cell Biol.* **128**, 995-1002.
9. Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L. T. (2001) RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* **276**, 7820-7826
10. Ho, T. H., Charlet, B. N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., and Cooper, T. A. (2004) Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *Embo J* **23**, 3103-3112
11. Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2004) Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 495-507

12. Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W., and Swanson, M. S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* **302**, 1978-1980
13. Ho, T. H., Bundman, D., Armstrong, D. L., and Cooper, T. A. (2005) Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1539-1547
14. Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2006) Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11748-11753
15. Rau, F., et al. (2011) Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nature structural & molecular biology* **18**, 840-845
16. Lee, Y., Samaco, R. C., Gatchel, J. R., Thaller, C., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (2008) miR-19, miR-101 and miR-130 co-regulate ATXN1 levels to potentially modulate SCA1 pathogenesis. *Nat Neurosci* **11**, 1137-1139
17. Lee, S. T., Chu, K., Im, W. S., Yoon, H. J., Im, J. Y., Park, J. E., Park, K. H., Jung, K. H., Lee, S. K., Kim, M., and Roh, J. K. (2011) Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Exp Neurol* **227**, 172-179
18. Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B. W., and Kato, S. (2007) DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* **9**, 604-611
19. Wilson, B. J., Bates, G. J., Nicol, S. M., Gregory, D. J., Perkins, N. D., and Fuller-Pace, F. V. (2004) The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol Biol* **5**, 11
20. Sellier, C., Freyermuth, F., Tabet, R., Tran, T., He, F., Ruffenach, F., Alunni, V., Moine, H., Thibault, C., Page, A., Tassone, F., Willemsen, R., Disney, M. D., Hagerman, P. J., Todd, P. K., and Charlet-Berguerand, N. (2013) Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Cell Rep* **3**, 869-880
21. Heo, I., Joo, C., Kim, Y. K., Ha, M., Yoon, M. J., Cho, J., Yeom, K. H., Han, J., and Kim, V. N. (2009) TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* **138**, 696-708
22. Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S. M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C.,

- Vergani, L., Novelli, G., and Botta, A. (2010) Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med* **8**, 48
23. Fernandez-Costa, J. M., Garcia-Lopez, A., Zuniga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipo-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiastui, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B., Perez-Alonso, M., Vilchez, J. J., Lopez de Munain, A., and Artero, R. D. (2013) Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* **22**, 704-716
  24. Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M. C., Meola, G., and Martelli, F. (2011) Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* **21**, 81-88
  25. Sato, T., Yamamoto, T., and Sehara-Fujisawa, A. (2014) miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nat Commun* **5**, 4597
  26. Dey, B. K., Pfeifer, K., and Dutta, A. (2014) The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev* **28**, 491-501
  27. Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Sestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M., and Horvitz, H. R. (2004) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* **5**, R68
  28. McCarthy, J. J. (2008) MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 682-691
  29. Kirby, T. J., Chaillou, T., and McCarthy, J. J. (2015) The role of microRNAs in skeletal muscle health and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* **20**, 37-77
  30. Yamamoto, M., and Kuroiwa, A. (2003) Hoxa-11 and Hoxa-13 are involved in repression of MyoD during limb muscle development. *Dev Growth Differ* **45**, 485-498
  31. Juan, A. H., Kumar, R. M., Marx, J. G., Young, R. A., and Sartorelli, V. (2009) Mir-214-dependent regulation of the polycomb protein Ezh2 in skeletal muscle and embryonic stem cells. *Mol Cell* **36**, 61-74
  32. Rosenberg, M. I., Georges, S. A., Asawachaicharn, A., Analau, E., and Tapscott, S. J. (2006) MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* **175**, 77-85
  33. Amack, J. D., Reagan, S. R., and Mahadevan, M. S. (2002) Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD. *J Cell Biol* **159**, 419-429

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2017/02/15

科技部補助計畫	計畫名稱: 探討miRNA參與在CUG重複序列擴增及MBNL1 knockdown抑制肌纖維母細胞分化的角色
	計畫主持人: 潘惠錦
	計畫編號: 102-2628-B-040-003-MY3      學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

102年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：潘惠錦			計畫編號：102-2628-B-040-003-MY3				
計畫名稱：探討miRNA參與在CUG重複序列擴增及MBNL1 knockdown抑制肌纖維母細胞分化的角色							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		2			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		2	篇	碩士論文	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇	
			研討會論文		0		
			專書		0	本	
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
其他		0					

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	4	人次	
		碩士生	2		
		博士生	1		
		博士後研究員	0		
		專任助理	1		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果					
(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

### 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

### 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以200字為限）

### 3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

本研究以NGS全面檢視在表現CUG擴增序列的細胞其分化過程中有被改變的miRNA，經由生物資訊軟體輔助分析、比對查找文獻資料、及qPCR、western等實驗驗證，歸納出受影響的miRNA及其下游標的基因，再以實驗驗證。因數據資料甚多，不論在分析或反覆驗證時都花費許多時間。最後我們聚焦在幾個較新的高保留miRNA，也分析了其中可能的下游基因之一的myoD，其3' UTR受幾個miRNA調控的證據。myoD是調控肌細胞分化非常重要的上游調控者，其本身受miRNA調控的現象是一新穎的發現，極具學術價值。另外藉由miRNA調控下游參與肌細胞分化的基因導致DM疾病肌肉組織的相關症狀也是一個新的發現，具有潛在應用價值。未來需要在病人的細胞或動物模式進一步驗證。

### 4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否  是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否  是

說明：（以150字為限）