

目次

	頁次
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
序 論.....	4
材料與方法.....	11
結 果.....	23
討 論.....	27
圖 表.....	31
參考文獻.....	39



中文摘要

(CTG/CAG)_n 三聯核酸重複序列之擴增突變與多種人類疾病之發生有密切關係。其中，位於染色體 19q13.3 區域內 DMPK 基因 3' 端不轉譯區的此一序列之擴增會造成強直型肌肉萎縮症(myotonic dystrophy)。在此研究中，我們嘗試以線蟲(*C. elegans*)作為疾病模式動物來研究強直肌肉萎縮症之可能致病機制。首先，我們以 PCR-cloning 方法將不同長度之 CTG 三聯核酸重複序列接入 pGEM-T 質體，再轉至含線蟲肌肉專一性驅動之綠螢光蛋白基因的載體。為模仿人體內真實情形，CTG 三聯核酸重複序列係插入綠螢光蛋白基因的 3' 端不轉譯區。經顯微注射產生之基因轉殖線蟲共有 *myo-3::gfp*，*myo-3::gfp(CTG)₅*，及 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 三種。其中，*myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* line 之螢光表現量約只有 *myo-3::gfp(CTG)₅* line 之 20% 以及 GFP line 之 7%，顯示擴增之 CTG 三聯核酸重複序列會降低其所在基因之表現。*myo-3::gfp(CTG)₅* line 之 *C. elegans* 身體移動速度正常且移動軌跡呈正常規則 S 型，而 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* line 線蟲之移動則明顯緩慢且不甚規則。此外，我們以線蟲的咽喉肌電圖 (EPG) 來觀察其肌肉生理發現 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* line 之肌肉收縮及舒張明顯異常。這些結果證實擴增之 CTG 重複序列會造成線蟲肌肉功能喪失。

Abstract

Expansion mutation of CTG repeat length in the 3'-untranslated region of human DMPK gene causes a dominantly inherited muscular disease, called myotonic dystrophy type1 (DM1). In this study we attempt to establish a DM1-disease animal model using transgenic *C. elegans*. We made transgenic constructs in which (CTG)_n was inserted into the 3'-untranslated region of GFP gene driven by muscle-specific promoter of *C. elegans*. Three lines, including *myo-3::gfp*, *myo-3::gfp(CTG)₅*, and *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀*, were generated. As judged from western blotting, the GFP protein level in *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* line is only about 20% of that in *myo-3::gfp(CTG)₅* line, and is about 7% of that in *myo-3::gfp*. This result indicates that expanded CTG repeats will greatly decrease the GFP gene expression. In addition, the rate and patterns of body movement as well as electropharyngealgram (EPG) of *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* line is significantly deviated from those observed in *myo-3::gfp*. *myo-3::gfp(CTG)₅* line presents normal muscle activity and coordination. These data demonstrate that expanded CTG repeats have pathogenic effects on *C. elegans*.

序論

人體因三聯核酸重複序列擴增突變造成之疾病至少有十四種 (Cummings and Zoghbi 2000)。按照核酸重複序列是否會被轉譯，這類疾病可分成二類。第一類疾病，包括 Fragile X syndrome (CGG), Fragile XE syndrome (GCC), Friedreich ataxia (GAA), Myotonic dystrophy (CTG or CCTG), Spinocerebellar ataxia type 8 (CTG), 及 Spinocerebellar ataxia type 12 (CAG)，是由位於不轉譯區 (untranslated region, UTR) 內之重複序列不正常增長所導致。第二類疾病統稱為”polyglutamine disease”，包括 Huntington’s disease, Kennedy disease, Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (Haw-River syndrome), 及 Spinocerebellar ataxias (type 1, 2, 3, 6, and 7)。其特徵為位於轉譯區 (translated region) 內一段不穩定的 CAG 核酸重複序列擴增突變 (expansion mutation) 而造成之神經退化性疾病 (neurodegenerative disease)。

Myotonic dystrophy (強直型肌肉萎縮症; DM) 是成人肌肉萎縮症中最常出現的一種神經肌肉方面的體染色體顯性遺傳疾病。在臨床症狀的表現上主要包括肌肉收縮後不易放鬆、肌肉 (臉頰、頸部、和四肢) 無力及漸進性萎縮等。除此之外亦可能影響眼睛、腦、皮膚、肺、心臟等器官及內分泌系統而出現白內障、智能障礙、禿頭、肺炎、心

臟傳導缺陷、糖尿病、和男性不孕等症狀。根據造成此一多系統疾病的基因突變情形，DM 至少有二種型式。最常發現的 DM 型式係因位於第十九對染色體長臂（19q13.3）上 DM protein kinase (DMPK) 基因 3'-untranslated region (3'-UTR) 內一段 CTG 三聯核酸重複序列發生擴增突變所導致（Brook et al. 1992；Fu et al. 1992；Mahadevan et al. 1992），稱為 DM1（OMIM 160900；The IDMC 2000）。此段 CTG 三聯核酸重複序列亦位於緊鄰的下游基因，SIX5，之驅動子區域內。在正常人的染色體內，此段 CTG 核酸重複次數是 5-35 次，而 DM 患者之 CTG 數目則超過 50 次，甚至可達數千次之多。若重複次數在 50-200 次之間，則大多無臨床症狀(asymptomatic carriers)或僅有輕微肌肉無力、白內障等症狀(benign DM)。隨著 CTG 核酸重複次數之增加，DM 患者之臨床症狀也愈加明顯；如超過 200 次以上，則顯現出典型肌強直症神經肌肉的特徵，並伴隨漸進性肌肉無力和四肢末端萎縮。典型的 DM (classic DM) 多在成人或成人早期(15~40 歲)開始發病，其 CTG 核酸重複次數絕大多數在 1000 次以下。最嚴重的 DM 型式是先天性的強直型肌肉萎縮症(congenital myotonic dystrophy，簡稱 CDM)，其臨床症狀通常在出生前或出生時就已顯現出來，此類患者的 CTG 核酸重複次數大多在 1000 次以上。主要症狀包括低肌張(hypotonia)、呼吸無力、發育遲緩等。所以 CTG 擴增重複序列的長度與患者的發病

年齡成反比，而和疾病的嚴重程度成正比，其(CTG)_n的 n 值愈大，通常發病年齡越早，而且發病症狀也越嚴重。第二種 DM 型式(DM2; OMIM 602668)，與 DM1 的臨床症狀幾乎一樣，是因位於第三對染色體長臂(3q21)上 zinc finger protein 9 基因(ZNF9, 鋅手指蛋白基因)第一個 intron 內一段 CCTG 四聯核酸重複序列發生擴增突變(50~100,000 repeats)所導致(Liquori et al. 2001)。

這二種 microsatellite 擴增突變皆發生於主要表達在肌肉細胞之基因的非密碼區(non-coding region)，不會改變所在基因之蛋白質特性。因此，其作用之分子機制可能透過改變 DMPK 及 ZNF9 等基因之轉錄效率以及 RNA 正常之加工處理 (processing) 和運輸 (transportation)。此一說法係假設 DMPK 及 ZNF9 基因作用在同一細胞內途徑，因而影響到同樣細胞功能，造成相同臨床症狀。目前對於 DM2 病人體內 ZNF9 基因表達及其 RNA processing 和 transportation 情形尚不清楚。就 DMPK 而言，有報告指出 DM1 病人 DMPK 的 RNA 和 蛋白質濃度皆比正常人低，顯示 CTG 擴增突變直接影響 DMPK 基因的表現 (Hofmann-Radvany et al. 1993 ; Fu et al. 1992)。此外，擴增後之 (CUG) tract 可能會使得 DMPK RNA 無法被送出核外造成核滯留 (nuclear retention)(Davis et al. 1997)。最近的研究顯示 (CUG) tract 亦會影響 DMPK RNA 的 processing ，使

得 DMPK mRNA isoforms 在核內外的 ratio 發生改變 (Tiscornia and Mahadevan 2000)。為探討 DMPK 基因與 DM 疾病之間的相關性 , Reddy 及 Jansen 等人利用基因剔除 (gene knock-out) 技術把 DMPK 基因從正常的老鼠體內剔除 , 他們發現這些老鼠有晚發性漸進性肌病 (progressive myopathy) 產生 , 並出現心臟傳導不良 , 甚至因而喪失生命之情形 , 但並沒有出現肌強直、肌肉萎縮等典型 DM 症狀 , 顯示 DMPK 在維持骨骼肌的構造及功能上是必須的 , 卻不是造成 DM 的唯一關鍵因素 (Reddy et al. 1996 ; Jansen et al. 1996 ; Berul et al. 1999)。

此外 , CTG 的倍增突變會改變臨近區域染色體的構造 (Otten et al. 1995) , 造成很強的核體位置元素 (nucleosome positioning elements) (Wang et al. 1994 ; Wang et al. 1995)。核體 (nucleosome) 是染色體構造的基本單位 , 由 146 bp DNA 纏繞八個組織蛋白複合體 (octamer of histone proteins) 而形成 , 此種構造會抑制轉錄之進行使基因無法表達。由於 nucleosome 形成的效率隨 CTG 的倍增程度而增加 , 所以 CTG 的倍增突變有可能影響到某些基因 (如 SIX5 , 亦稱為 DMAHP) 之表達而造成強直型肌肉萎縮症。Klesert 及 Thornton 等人觀察到 DM 患者肌肉細胞內 SIX5 之 RNA level 較正常人為低 (Klesert et al. 1997 ; Thornton et al. 1997) , 而且是隨 CTG 倍增程度之增加而降低。由於

SIX5 是一 homeodomain-encoding gene，其基因產物很有可能是一種與個體發育有關的轉錄因子。利用 β -gal 為 reporter gene 接至 SIX5 基因驅動子 (promoter) 區域之下游而做成 fusion gene (融合基因)，然後以轉殖動物 (transgenic mice) 當模型，Heath 等人(1997)觀察此 fusion gene 在老鼠胚胎發育過程之表達發現 SIX5 基因之驅動子在 12.5 天的鼠胚胎即活化，而且在多個出現 DM 臨床症狀的器官有活性。雖然他們的結果並不能代表真正 *in vivo* (活體) 的情形，這些觀察也顯示 SIX5 是一與個體發育有關的基因，並且 CTG 倍增突變造成 SIX5 基因表達之不足(haplo-insufficiency)可能與 DM 的多系統臨床症狀(multisystematic symptoms)有關。的確，基因轉殖小鼠模式的研究證實 SIX5 gene loss 會造成白內障(Klesert et al. 2000; Sarker et al. 2000)。

除了對基因表現有影響之外，最近愈來愈多證據顯示 CTG 倍增使得 DMPK RNA 上 CUG 重複數目增加，因而搶走過多的 CUG-binding protein，造成”gain-of-function mutation”，干擾或破壞其他 CUG-containing RNA 之代謝和運輸(Wang et al. 1995; Korade-Mirnic et al. 1998) 例如，胰臟素接受體訊息核糖核體(insulin receptor mRNA) 之 level 在 DM 病人肌肉內比正常肌肉組織為低(Morrone et al. 1997)。 Human cardiac troponin (cTNT) RNA 之正常剪

接(splicing)在 DM 病人橫紋肌及在表達出含 CUG 序列 RNA 之正常細胞內會被破壞(Philips et al. 1998)。此二個基因都含有 CTG repeat。利用基因轉殖小鼠模型, Mankodi et al. (2000)的研究結果顯示 expanded (CUG)_n repeats 的確會造成肌強直(myotonia)及肌病變(myopathy)等 DM 之主要症狀。將帶有 300 個 CUG 重複序列之人類 DMPK 基因轉殖至老鼠體內, Seznec (2001)以動物模式更完整地重現 DM 臨床病變, 並且更進一步顯示 CUG expansion 之 trans-dominant effect 不僅作用在肌肉, 亦造成腦部異常。

近年來, DMPK 及 SIX5 在 *C. elegans* genome 的同源基因 (homologue), LET-502 and ceh-32 相繼被發現 (Wissmann et al. 1997; Cassata et al. 1999)。有趣的是這二個基因, LET-502 與 *C. elegans* 胚胎發育過程中的皮下細胞外形改變 (hypodermal cell shape change) 有關而 ceh-32 可能造成 Vab phenotype (notched head), 似乎和身體肌肉 (body muscle) 功能都沒有直接關係。最近, *C. elegans* 體內一種肌肉特異性的 RNA binding protein (muscle specific RBP), 稱為 ETR-1, 則被發現會結合至 DMPK-3' UTR (CUG) tract (Milne and Hodgkin 1999)。Milne et al. (1999), 使用 RNA 干擾技術 (RNA-mediated interference) 抑制 ETR-1 RNA 功能因而造成胚胎致死 (embryonic lethality)。由以上研究結果顯示 ETR-1 的確與肌肉發

育有關並意味著擴增突變 (CUG) tract 可能亦在 *C. elegans* 以及其他低等生物造成神經肌肉方面之症狀。為在 *in vivo* 情況下探討擴增突變 (CUG) tract 對低等生物之生理效應，並考慮到(1)基因轉殖動物遺傳發育特性之瞭解，(2)肌肉疾病呈現症狀之研究的便利，及(3)飼養容易、飼養空間不大及繁殖能力強等因素，在本研究中，我們利用基因轉殖線蟲(*transgenic C. elegans*)探討 3'-UTR 內 CTG 三聯核酸重複序列長度對線蟲肌肉電生理、肌肉活動力、蟲體移動(肌肉協調性)、以及對轉殖基因之表達等等之影響。希望經由建立此一模式有助於 DM 致病機制闡釋以及對於疾病相關基因在線蟲之生理功能有進一步瞭解。此外，由於核酸重複序列廣泛存在於真核生物基因體內，此一系統之建立，將有益於探討各類核酸重複序列擴增突變在發育及生理上影響。

材料方法

A. *Myo-3::gfp* 質體

此質體由台大動物系吳益群老師提供。

B. *myo-3::gfp (CTG)₅* 質體

首先，分別合成 5'-CCGGACTGCTGCTGCTGCTGT-3' 及 5'-CCGGACAGCAGCAGCAGCAGT-3' 兩個 primers，然後以逐漸降低溫度的方式使其粘合。粘合的條件及步驟如下：先將等量 primers 混合於 1.5 ml 離心管，再將此離心管置於 95 °C 水浴 6 分鐘，之後依序轉置入 85 °C，75 °C，65 °C，60 °C，及 55 °C 水浴各 6 分鐘完成粘合。粘合之雙股 DNA 兩端含 *BspEI* 限制酶切割後的序列。接著，將 *BspEI* 限制酶 (New England Biolabs, Inc.) 切割後的 *Myo-3::GFP* 與已粘合的 DNA 產物利用 T4 DNA ligase 進行連接，並轉殖入 JM109 菌體內。

C. *myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* 質體

此質體由李逸揚學長提供。其構築步驟簡述於後；首先，將 (CTG)₁₀ 與 (CAG)₁₇ primers 以 94 °C，5 分鐘，(94 °C，30 秒；37 °C，1 分鐘；72 °C，6 分鐘) 30 次循環，72 °C，10 分鐘的反應條件合成。合成的產物經膠體電泳分離，由膠體中回收分子量適當的片段 (Viogene, Inc.)，以 T4 DNA ligase 將回收之 (CTG)₁₂₀ 三聯核酸重複序列片段接入 pGEM-T easy 質體，選殖出含 pGEM-T (CTG)₁₂₀ 質體之 JM109。接

著，以 *EcoRI* 限制酶 (New England Biolabs, Inc.) 切出 (CTG)₁₂₀ 片段，經膠體純化後以 Klenow 酵素(New England Biolabs , Inc.) 補齊(blunt-ended)。之後，將其接入經過 *BspEI* 限制酶切斷，Klenow 酵素補齊的 *Myo-3::gfp* 質體，並以 DNA 定序確認之。

2. 線蟲的培養

A. 一般線蟲的培養

線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 是一種無寄生性，陸棲性的低等生物。其成蟲約有 1mm 的長度。野生的線蟲生長在土壤裡以微生物為主要的食物。在實驗室中，線蟲培養在有 *E. coli* 菌屬 OP50 菌株的 NGM agar 培養皿(1.5% Agar , 0.3% NaCl , 0.25% peptone , 0.0005% Cholesterol , 1mM CaCl₂ , 1mM MgSO₄ , 25mM potassium phosphate (pH6) 並於 15 °C 培養。

B. *lin-15* 突變株線蟲的培養

本研究中顯微注射所使用的線蟲皆是以 *lin-15* 基因突變線蟲進行，*lin-15* 是一個與線蟲生殖孔形成有關的基因，此突變株的線蟲於 15 °C 培養時生殖孔呈現正常性狀而當培養於 25 °C 時則會呈現出突變的性狀，即一個個體產生多個生殖孔。若注入 *lin-15* 正常基因到 *lin-15* 突變株線蟲體內，則可以使此突變株恢復正常狀態，即在 25 °C 或 15 °C 的培養箱皆是單一生殖孔。

3. 線蟲的顯微注射

A. DNA 溶液的製備

一般的 alkaline lysis DNA 製備法所製備出的 DNA 未經純化前不適用於線蟲的顯微注射。我們使用於線蟲顯微注射的 DNA 溶液都經以 QIAGEN plasmid mini kit 所純化。在本實驗中我們將各個長度的 *myo-3::GFP (CTG)_n* 質體與含有 *lin15* 基因的質體分別以 20 ng/ μ l 與 100 ng/ μ l 的濃度溶於 injection 緩衝液(20 mM potassium phosphate (pH 7.5) , 3mM potassium citrate (pH 7.5) , 2% polyethylene glycol (molecular weight 6000)) 中。

B. Agarose pads 的製備：

準備 1.8% agarose , 使用巴斯德吸管滴一滴在 24x60mm 之蓋玻片上 , 再用另一片子蓋玻片蓋住滴有膠體的蓋玻片。等膠體凝結後 , 將上面蓋玻片掀開 , 讓膠體於室溫下繼續風乾至少三小時 , 此時膠體會形成一層薄膜 , 即可使用。或者 , 將凝結後含膠體之玻片(不含上蓋玻片)置于 80 °C 烘箱 1 小時 , 待完全乾後置於室溫下備用。

C. 顯微注射針的製備:

線蟲顯微注射針是以玻璃的毛細管 (Kwik - FilTM , Borosilicate Glass Capillaries, Lot number 9908365 , Quantify 500 , Item Number 1B100F-6) 使用拉針器 (Sutter, Instruments, p-97) 拉製而成 ,

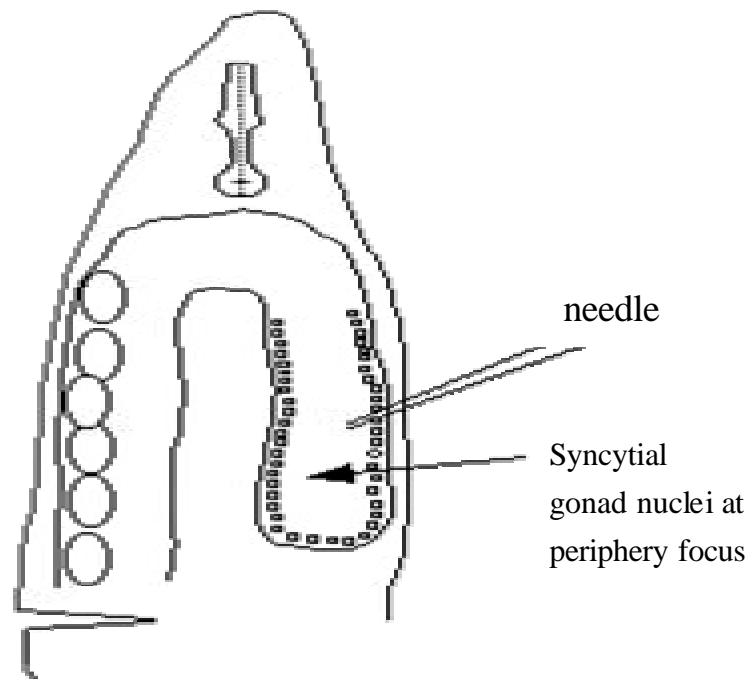
其尖端開口的直徑依需要大小製作。

D. 線蟲顯微注射的流程

先使用裝填 DNA 溶液的針 (Blaubrand® intraMARK Cat. No 708745) 將 DNA 注入顯微注射針內，並將顯微注射針架設於顯微鏡 (Zeiss Axiovert 200) 的操作手臂上，此時將 Halocarbon oil (Halocarbon product, River Edge, NJ) 滴一滴在 Agarose pad 上，並將待注射的線蟲放置 Agarose pad 上，在具有相位差 (differential interference contrast; DIC) 鏡頭的顯微鏡下，將顯微注射針小心推入線蟲的生殖腺中，再使用 microinjector (PROGRAMMABLE MICROINJECTOR IM 300) 將 DNA 溶液注入生殖腺 (gonad)，再以 M9 緩衝溶液 (Na_2HPO_4 5.8 g, KH_2PO_4 3.0 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1.0g, 加入 1L 的二次水，參照 Horvitz lab version)，讓已進行過顯微注射的線蟲回復生理活性，等約十五分鐘後再將蟲挑入新的 NGM plate。

4. 基因轉殖線蟲的篩選

我們將已復原的線蟲培養於 25℃，其子代若呈現單一生殖孔性狀者則為 F1。我們挑出的 F1 每一隻單獨培養於一個 NGM plate 中，當 F1 的子代 (即為 F2) 長成成蟲時，觀察若 F2 亦為單一生殖孔性狀者即表示得到一個 line。



註：此圖代表著線蟲顯微注射位置的解剖圖。

5. 基因轉殖線蟲的保存

由於顯微注射的基因在線蟲體內是以 extra chromosomal array 的形式存在並非穩定的嵌入染色體中，所以我們將每個 line 的線蟲都先以 M9 緩衝液清洗，再以等體積的比例加入 freezing solution(0.1 mM NaCl, 0.05mM KH₂PO₄, pH 6.0, 30% glycerol, 0.6M MgSO₄), 並將含有線蟲的溶液分裝至 1.5ml 離心管中，以漸進式降溫的方法，將線蟲儲存於-80 冰箱中。

6. 線蟲 DNA 萃取法

將一隻成蟲放入含 3μl 線蟲 DNA 萃取液 worm lysis 溶液 (50 mM KCl, 10mM Tris pH 8.2, 2.5mM MgCl₂, 0.45% NP - 40, 0.45%

Tween 20, 0.01% gelatin) 的微量離心管中，迅速將離心管放入-80 冰箱，10 分鐘後取出並接著以 60 °C 加熱一小時，95 °C 加熱 15 分鐘，最後將萃取液以 PCR Purification kit (Viogene, Inc.) 純化。操作方法如 PCR Purification kit 所附的手冊。

7. 單一線蟲基因聚合酶連鎖反應 (Single worm PCR)

在此研究中，單一線蟲基因聚合酶連鎖反應方法應用於下列兩種情況：1) 複製 (CTG)₅ 片段。聚合酶連鎖反應反應總體積為 1X 反應緩衝液 20 μ l (內含 75 mM Tris, pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% (v/v), Tween20)) (AB gene), 0.1 mM dNTP, 0.5 μ M 引子 (primers) (gfp-c & let-858) (生工有限公司), 0.3 μ l Thermoprime Plus DNA polymerase (cat# AB-0301, AB gene) 以及 (材料與方法 6 所述) 從一隻線蟲萃取所得到的 DNA。PCR 反應條件為 94 °C , 5 分鐘 , (94 °C , 30 秒 ; 62 °C , 30 秒 ; 72 °C , 30 秒) 30 次循環 , 72 °C , 7 分鐘的反應條件合成。

2) 複製 (CTG)₁₂₀ 片段。聚合酶連鎖反應反應總體積為 20 μ l, 成分包括上述線蟲基因萃取的 DNA , 1X cDNA 聚合酶連鎖反應緩衝液, 1 M GC -melt (cat# K1907-1,-y, Clontech, Palo Alto, CA) , 0.1 mM dNTP, 0.5 μ M 引子 (primers) , 0.8 μ l Advantage - GC cDNA DNA polymerase Mix (cat# 8419-1, Clontech, Palo Alto, CA) , 以及從一隻線蟲萃取所得到的 DNA。反應條件為 94 °C , 5 分鐘 , (94 °C , 30 秒 ; 62 °C , 30

秒；72 °C，1.5 分鐘）30 次循環，72 °C，10 分鐘的反應條件合成。
引子分別為 gfp-c primer (forward primer), 5'-ggacg aac tatacaaaagccc-3',
以及 let-858 primer (reverse primer), 5'-ttaagttgctgcaa ccgcag c-3'。熱循
環器機型為 Perkin Elmer 2400 thermal cycler。

8. 蛋白質凝膠電泳分析 (SDS-PAGE)

A. 樣本的準備：

先將線蟲繼代到新鮮的，塗有 OP50 菌的 NGM plate，兩天
後線蟲長滿了整個 NGM plate (大約 10,000/ plate) 且將 OP50 菌幾乎
全部吃完達到飢餓狀時，使用 M9 緩衝溶液將線蟲從 NGM plate 沖洗
到 1.5 ml 的微量離心管，然後放入離心機以 13000rpm, 1 分鐘條件將
蟲體離下。接著將上清液丟棄，加入 50µl protein lysis 緩衝液 (0.5M
Tris-HCl, pH 6.8, 5 ml, 20% SDS, 4 ml, β-metecapethanol, 1 ml, 50%
glycerol, 4 ml, d₂H₂O, 6 ml)，放置於沸水加熱三分鐘後，立刻置於冰
上，等冷卻後放入離心機內離心 30 秒取出置於冰上。接著將 1.5 ml 微
量離心管內上清液使用 P200 的微量吸管吸至另一個 1.5 ml 微量離
心管內，置於冰上等待測總蛋白的濃度。為測量萃取溶液中蛋白質濃
度，我們用 Bio-Rad protein assay (Catalog # 500-0006)。首先用標準
濃度蛋白質作出一吸光值-濃度關係之標準曲線，方法如下：BSA(濃
度 1µg) 取 0 µl, 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl 分別加至 100 µl, 99 µl, 98 µl, 97 µl,
96 µl 的 0.125 M NaCl，接著使用光譜測定儀偵測 OD 值，由這些 OD

值劃出一個曲線圖。接著取蛋白質樣本 5 μ l 加上 95 μ l, 0.125M NaCl 使用光譜測定儀偵測 OD 值。根據這些所測到的 OD 值的點落在標準曲線的位置，進行換算求出蛋白質的濃度。

B. 膠體的製備

配製 3.0 ml 含有 SDS 之 15% polyacrylamide (組成如下：
d₂H₂O, 1.47 ml; Acrylamide : bisacrylamide = 29 : 1, 1ml; 1.5M Tris, pH 8.8, 0.83 ml ; 20 % SDS, 16.7 μ l ; 10 % APS, 16.7 μ l ; TEMED, 1.67 μ l)
的下層膠 (running gel) 放入已架設好的電泳玻璃，再以 95 % 的酒精壓平液面，待下層膠凝集後，倒掉酒精。再倒入 stacking gel 2.0 ml 含有 SDS 之 3% polyacrylamide (組成如下 d₂H₂O, 1.7 ml ; Acrylamide : bisacrylamide = 29 : 1, 0.15 ml ; 1 M Tris- HCl, pH 6.8, 20 μ l ; 20 % SDS, 10 μ l ; 10 % APS, 11 μ l ; TEMED, 2 μ l)，插入齒模 (comb)。確定膠凝集後拔出齒模，並將玻璃連同膠置於電泳槽中。另一方面將待分析的蛋白質溶液加入濃度 1 : 1 的 protein loading buffer (0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 5 ml, 20% SDS, 4 ml, β -metecaptethanol, 1 ml, 50% glycerol, 4 ml, 0.004 mg bromphenol blue, 6 ml d₂H₂O) 以 100℃，2 分鐘煮沸之後，將其置於冰上，待其冷卻後，以轉速 13000rpm 離心 1 分鐘。之後，取其上清液以微量吸管注入凝膠之凹槽 (well) 中，保持電功率 2W (即電流通過膠面的電功率為 2W)，進行 3.5 小時的蛋白質凝膠電泳，以分離蛋白質。

9. 西方點漬法 (Western blot)

我們用此方法比較各基因轉殖線蟲體內 GFP 蛋白表現量，此外，為確定注入每個凝膠之凹槽的蛋白質是否等量，同時用 β -tubulin 當作 internal control。偵測 GFP 之方法如下：取適量的蛋白質樣品，以 SDS-PAGE 分離蛋白質後，卸下膠體，平鋪在浸泡過轉印緩衝液 (transfer buffer: glycine, 14.4 g; Tris, 3g; methanol, 200 ml; 加水補足至 1L) 的 PVDF 膜上，再覆蓋三張 3MM 濾紙及海綿墊，置於轉漬器中 (BIO-RAD)。固定電功率 16W 的功率轉漬 1 小時。取出 PVDF 膜，正面朝上置於阻隔緩衝液 (1X casein, Vector Laboratories, Inc.) 內，室溫下作用(輕微搖晃)40 分鐘後，加入 1:1500 稀釋之 anti-GFP Ab (cat# sc - 8334, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)，在室溫下作用 30 分鐘。之後，以適量的 1X casein 清洗三次，每次 4 分鐘 接著加入 1:3000 稀釋之 Biotinylated anti - rabbit IgG (內含在 Vectastain ABC-AmpTM kit, cat# Ak6601, Vector Laboratories, Inc.)，在室溫下作用 30 分鐘後，以適量的 1X casein 清洗三次，每次 4 分鐘 之後，加入適量的 1X casein 以及含 avidin 及 biotinylated alkaline phosphatase 的 Vectastain ABC-AmpTM Reagent A & B (每 1ml casein 各加入 1 ml Reagent A & B)，在室溫下搖晃 20 分鐘後將溶液倒掉。然後加入適量 0.1M, Tris - HCl (pH 9.5) 作用 1 分鐘，以平衡 PVDF 膜之 pH 值。將溶液倒掉，加入

適量的受質反應溶液 (DuoluX™ Chemiluminescent Substrate), 經鹼性磷酸酶作用產生化學冷光。接著使用化學冷光螢光分析儀偵測冷光的強度。β-tubulin 之偵測使用之阻隔緩衝液是 1X TTBS (10 mM, Tris-HCl, pH 7.8; 150 mM, NaCl; 0.25% , Tween 20) 加上 5% 脫質奶粉 ; 1°抗體為 anti-β-tubulin Ab (稀釋倍率 1: 1000 , cat# MS - 582-PO, 生工有限公司)。 2°抗體為接有 HRP 之 Anti - mouse IgG (稀釋倍率 1: 3000 , cat# sc - 2005, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)。 受質反應溶液為 (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Product# 34080, Pierce Chemical Company)。

10. 線蟲的足跡 (locomotion) 比較

首先我們將成蟲挑至新鮮含有 OP-50 之 NGM plate , 放置 25 ℃ , 四小時後 , 觀察其線蟲移動的型態之差異。接著使用數位影像處理軟體 (Carl Zeiss Inc. Axio Vision 3.0) 分析紀錄線蟲移動的型態。

11. 線蟲活動力的比較

我們計算線蟲活動力時的前兩天 , 先將線蟲繼代。取成蟲 (在解剖顯微鏡下可觀察到明顯白色的生殖孔 , 其生殖孔內有極小的黑色顆粒。) 挑到含新鮮 OP-50 的培養皿 (培養的條件為 16±1 小時) , 放置 25 ℃ , 四小時後在解剖顯微鏡下觀察線蟲之移動。咽喉往後收縮 , 蟲體往前移動 , 這是線蟲正常的移動型態。移動 s 形算一次 , 計算三分

鐘內移動的次數。若是線蟲在移動的當中，有脫離菌叢，或有前後移動及往旁邊移動之情形，則不予計算。

12. 螢光比較

首先我們先取 3.5 cm 含新鮮 OP-50 的培養皿（培養的條件為 16 ± 1 小時），接著將線蟲挑入，在解剖顯微鏡下先找到我們預備觀察的視野，接著使用 FITC 濾片觀察螢光強度。影像攝取及分析係利用數位式低照度彩色攝影機 (CCD) 及 Media Cybernetics Image Pro Plus 4.1 (Axiocam, Carl Zeiss, Inc.) 處理軟體。為客觀呈現不同 (CTG)_n 長度對螢光強弱的影響，我們先分析比較約 100 隻不同質體基因轉殖線蟲後，將它們之間螢光強度對比以代表圖(圖四)示之。

13. 線蟲咽部肌電圖之偵測

取硼砂玻璃 (borosilicate glass capillaries, 1.0 mm o.d., 0.5 mm i.d.)，使用拉針器 (Sutter, Instruments, p-97) 製作一吸取紀錄電極 (suction pipet)。吸取紀錄電極其尖端開口的直徑一線蟲的大小製作出直徑約 20~40 μ m。當電極充填有溶液 (組成如下 mM: Potassium gluconate 136.5, Potassium chloride 17.5, Sodium chloride 9, Magnesium chloride 1, Hepes 10, EGTA 0.2, pH 7.2) 其電極的阻抗為 200 k Ω ~ 1M Ω 。另以銀/氯化銀線當作參考電極。吸取紀錄電極製作好以後 (其側邊接有一塑膠針管)，開始吸取線蟲將其頭部至咽喉段入以便做咽部肌電圖之測量其細胞外液 (組成如下: Sodium chloride 6 mM,

Magnesium chloride 5 mM, Hepes 5 mM, pH 7.4)。紀錄電位變化是由電流放大儀 (AxoClamp) 接收訊號，其肌電圖評估參考 Raizen 與 Avery (1994) 之報告，此咽喉肌電圖之測量可評估骨骼肌活性是否受到影響。

結果

一、 *myo-3::gfp (CTG)_n* 質體構築

為探討不轉譯區內擴增突變之(CTG)_n 對線蟲肌肉功能之影響，我們將不同長度 CTG repeats 插入綠螢光蛋白(GFP)表現基因之 3' UTR (3'-untranslated region)，用 *myo-3* gene promoter 來驅動 GFP 之表達。質體構圖簡繪如圖一：

myo-3 gene 表達在線蟲的體壁肌肉細胞(body wall muscle) 在此研究中所使用之轉殖基因質體包括：*myo-3::GFP*，*myo-3::GFP (CTG)₅*，*myo-3::gfp (CTG)₁₂₀*，及 *myo-3::gfp (CTG)₂₀₀* 等四種。其中 *myo-3::gfp (CTG)₅* 與 *myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* 質體構築分別如圖一及圖二所示。*myo-3::gfp (CTG)₂₀₀* 質體構築方式及步驟與 *myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* 一樣(請參考材料與方法)。這些質體構築後皆經 DNA 定序確認。

二、基因轉殖線蟲的生產及確認

經顯微注射的方式將 *myo-3::gfp (CTG)_n* 表達質體殖入線蟲體內，我們發現不同長度(CTG/CAG)_n 三聯核酸重複序列基因轉殖蟲體成功產生 line 的情況不同，其中 *myo-3::gfp (CTG)₂₀₀* 無法產出 F2 line，所以沒能做進一步分析。而 *myo-3::gfp*，*myo-3::gfp (CTG)₅*，及 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 則順利產生多個 lines。然而，由於我們係將 DNA 打入生殖腺，卵子再將 DNA 包進去，轉殖基因並沒有嵌入線蟲染色

體，所以表達這些質體之蟲體每一傳代之間會逐漸失去轉殖基因而使其影響逐漸消失，因此，此研究中所分析之基因轉殖線蟲皆在第五代 (F5) 以內並經 PCR 或 PCR-based Southern blot analysis 確定 CTG tract 之長度(圖三)。

三、CTG 三聯核酸重複序列對 GFP 基因表達影響分析

為了解 CTG 序列對基因表達之影響，我們利用螢光解剖顯微鏡觀察 *myo-3::gfp(CTG)₅*、*myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* 及 *myo-3::gfp only* 各個 line 之綠螢光蛋白表現情形(圖四)。結果顯示 *myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* 會大幅降低基因轉殖蟲體綠螢光強度，而 *myo-3::gfp(CTG)₅* 之影響則較不明顯。進一步將蟲體中蛋白抽出，以 western blot 的方式分析蟲體內綠螢光蛋白的量(圖五)，證實 *myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* 基因轉殖蟲體的綠螢光蛋白量明顯比 *myo-3::gfp* 低很多(降低約 93%)。而 *myo-3::gfp (CTG)₅* 基因轉殖蟲體的綠螢光蛋白量約為 *myo-3::gfp* 蟲體的 40%。因此，CTG 序列長度的確會影響基因之表達，長度愈長，影響愈大。

四、*myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* 造成線蟲肌電圖異常

為評估骨骼肌活性是否可能受到擴增之 CTG 三聯核酸重複序列影響，我們分析比較了一個 *myo-3::gfp* line，一個 *myo-3::gfp(CTG)₅* line，及三個 *myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* lines 之間肌肉電生理變化。其咽喉肌電圖之代表圖示於圖七。波峰代表肌肉收縮，而波谷則代表肌肉舒

張。我們發現所有 *myo-3::gfp* 線蟲之肌肉收縮電壓大於 2.0 mV，肌肉舒張電壓大於 2.2 mV。在四隻受檢之 *myo-3::gfp(CTG)₅* 線蟲中，只有一隻其肌肉收縮電壓小於 2.0 mV。而在三個 lines 之 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 線蟲，至少 50%之線蟲的肌肉收縮出現異常(電壓小於 2.0 mV)，同時有 7~43%之(CTG)₁₂₀ 線蟲肌肉舒張電壓小於 2.2 mV (表一)。顯然，CTG 三聯核酸重複序列長度達 120 次時會造成肌肉電生理變化。

五、基因轉殖線蟲肌肉活動力分析

由肌肉電生理分析結果顯示 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 會使得骨骼肌活性降低，為進一步了解其對肌肉活動力影響，我們比較了表達不同 CTG 重複序列長度之線蟲在同一單位時間內移動距離。在實驗過程中，若偶而有前進中，蟲體又往後收縮移動，或者蟲體已爬離菌叢情形，則不予計入實驗結果。首先，我們觀察到 *myo-3::gfp* 及 *myo-3::gfp(CTG)₅* 線蟲移動型態與正常非基因轉殖線蟲移動一樣，皆以 S 型前進且呈現正常規則彎曲。*myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 線蟲移動亦以之 S 型前進，但其彎曲弧度則時大時小，呈現不規則變化(圖七)，顯示 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 線蟲肌肉協調性可能受到影響。不論其 S 型彎曲弧度，當比較這些線蟲三分鐘內 S 型移動次數，我們發現 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 線蟲移動速度顯然緩慢許多(表二)。*myo-3::gfp* 及

myo-3::gfp(CTG)₅ 線蟲每三分鐘移動約 75-80 次，而 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 線蟲則平均低於 50 次，在統計上有非常明顯差異。

討論

本研究中我們比較不同長度之 CTG 三聯核酸重複序列對線蟲肌肉生理之效應。我們將非擴增性(5 repeats)及擴增性(120 & 200 repeats)之 CTG 序列置於綠螢光蛋白基因 3'端非轉譯區內，並表達在體壁肌肉細胞，進而探討含(CUG)_n之外生性 GFP mRNA 是否如基因轉殖小鼠模型所顯示會產生顯性效應(dominant effect)造成肌肉細胞病變(Mankodi et al., 2000)。

在以顯微注射方式產生基因轉殖線蟲過程中，120 隻注入 *myo-3::gfp(CTG)₂₀₀* 之線蟲皆無法順利產出後代。*myo-3::gfp*，*myo-3::gfp(CTG)₅*，及 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 之產出比例則在 20~33%之間。我們懷疑 GFP (CUG)₂₀₀ mRNA 可能會造成線蟲在發育早期階段死亡。在人類，雖然目前並無證據顯示 CTG 序列長度與婦女懷孕流產有直接關係，DM1 家族中的確常出現女性患者有懷孕流產情形。未來，若能檢查 (CTG)₂₀₀ 之 F1 線蟲其體內受精卵發育過程，並調查發育終止情況是否普遍發生在 *myo-3::gfp(CTG)₂₀₀* 之受精卵，將能進一步探討其間關係及可能的作用機制。

由圖四及圖五可看出 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 之線蟲的螢光表現量比 *myo-3::gfp* 線蟲低很多，證明線蟲體內 CTG 序列長度過長會對所在

基因之蛋白質生產有嚴重影響。此一發現與基因轉殖小鼠體內 (CTG)₂₅₀ 並不會大幅降低所在基因蛋白表現量之觀察並不完全一致 (Mankodi et al., 2000), 顯示 CTG 序列對基因表達之影響可能會因不同物種而有所差異。由於 DM1 病人及基因轉殖小鼠在細胞核發現有 (CUG)_n RNA foci retention 現象, 未來, 可利用螢光原位雜交 (FISH) 方法來進一步調查 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 線蟲是否亦有 GFP (CUG)₁₂₀ mRNA 留在核內造成 nuclear foci retention, 並利用定量 RT-PCR 來證實 GFP 蛋白量減少係因 GFP 基因的轉錄效率降低, 或是因為轉錄後 RNA 代謝運輸出現問題所造成。

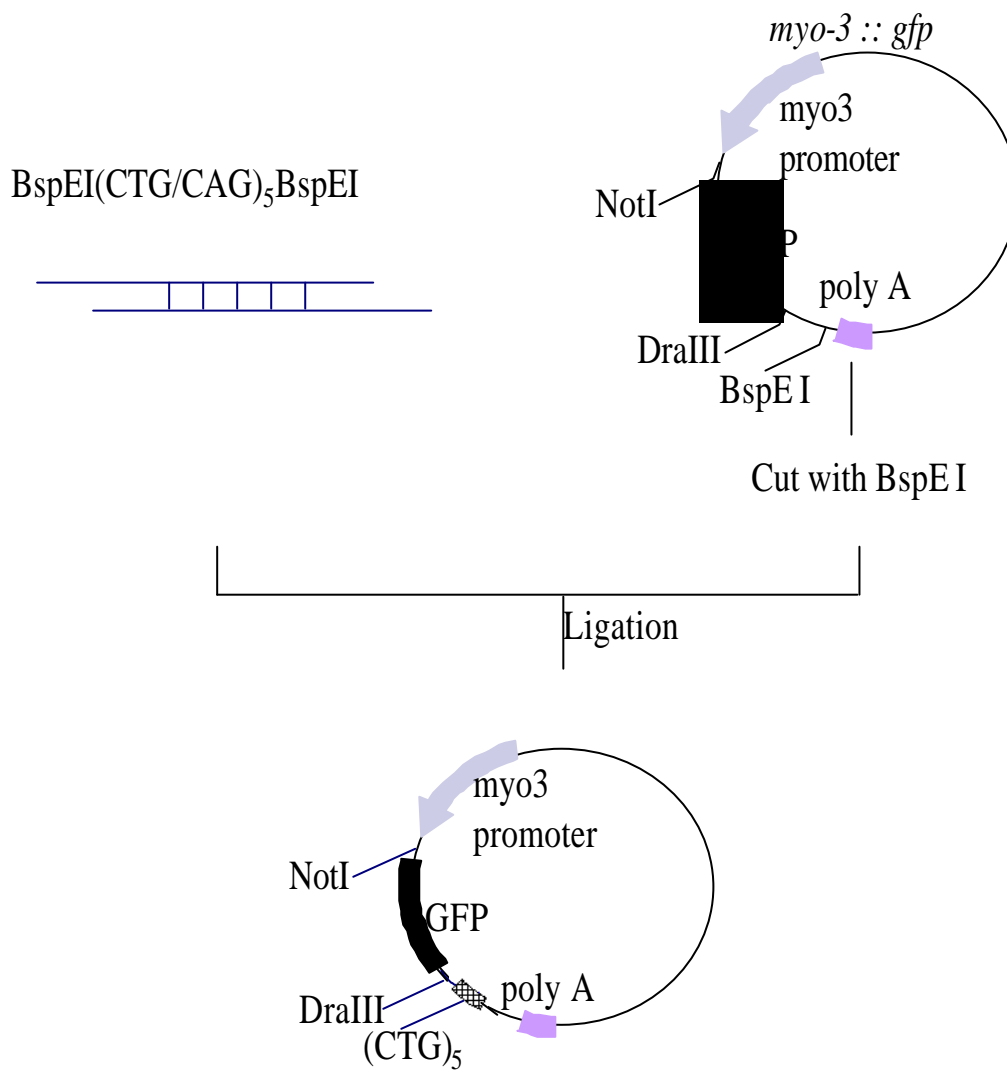
myo-3::gfp(CTG)₁₂₀ 除了會抑制 GFP 基因之表達, 也明顯降低線蟲的活動力及肌肉協調性(圖七及表二)並造成肌肉電生理異常(圖六及表一)。顯然, 這些症狀之發生並非外生性 GFP 蛋白表現的結果, 因為 *myo-3::gfp* 線蟲在這些方面表現與 *lin15* 非基因轉殖線蟲一樣正常(data not shown)。同時, DMPK 及 DMAHP 在線蟲基因體內的同源基因(homologue), LET-502 and *ceh-32*, 相繼被發現似乎和身體肌肉(body muscle)功能沒有直接關係。因此, 肌肉細胞內擴增之 CTG 重複序列不論其所在位置, 只要有含過長 CUG 之 mRNA 存在皆會造成肌肉細胞生理變化。擴增之(CUG)_n RNA 除了影響 polyadenylation (Wang et al. 1995)及 splicing (Philips et al. 1998), 近年來研究報告指

出，它亦可能透過 sequester CUG binding proteins, 如 ETR-1 (Milne and Hodgkin 1999), CUGBP1 (Timchenko et al. 2001), 以及 muscleblind (Miller et al. 2000; Mankodi et al. 2001), 而影響其他 CUG-containing RNA 之代謝。若果真是因為 CUG binding proteins 被擴增之 CUG tract 所吸附而造成生理異常，大量表達這些 CUG binding proteins 應可使 GFP (CTG)₁₂₀ 基因轉殖線蟲恢復正常。目前，實驗室內正進行此一研究。

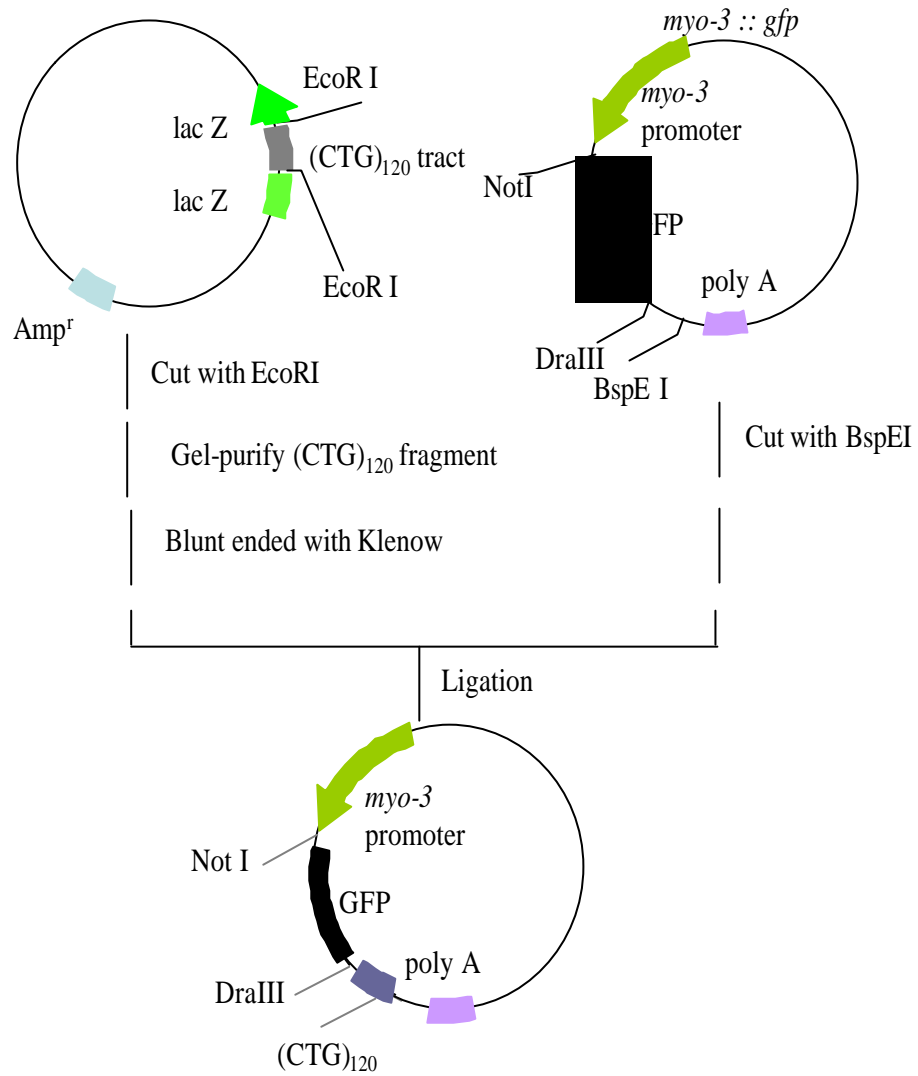
對於人及老鼠等哺乳類而言，(CTG/CAG)₅₋₂₀ 是一正常序列長度，在線蟲基因體內亦存在多個 (CTG/CAG)₂₋₁₀ 序列。我們的結果亦顯示 *myo-3::gfp(CTG)₅* 不會對線蟲之活動力造成明顯影響，亦不會使所在基因之表達大幅下降。為進一步了解相關致病機制，尋找受到 GFP (CUG)₁₂₀ RNA 影響之下游基因成為重要的下一步。目前已知有 insulin receptor (Morrone et al. 1997), troponin (Philips et al. 1998), tau (Sergeant et al. 2001) 等基因之 splicing 或 expression 在病人細胞內會發生變化。基本上，這些基因或含有 CTG tract, 或是構成肌肉細胞骨架重要分子。未來，利用定量 RT-PCR 比較此二類基因在 *myo-3::gfp(CTG)₅* 與 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 基因轉殖線蟲體內表現量差異或能找出相關作用基因。

到目前為止雖然仍未有任何證據顯示 (CAG)_n 三聯核酸重複序列

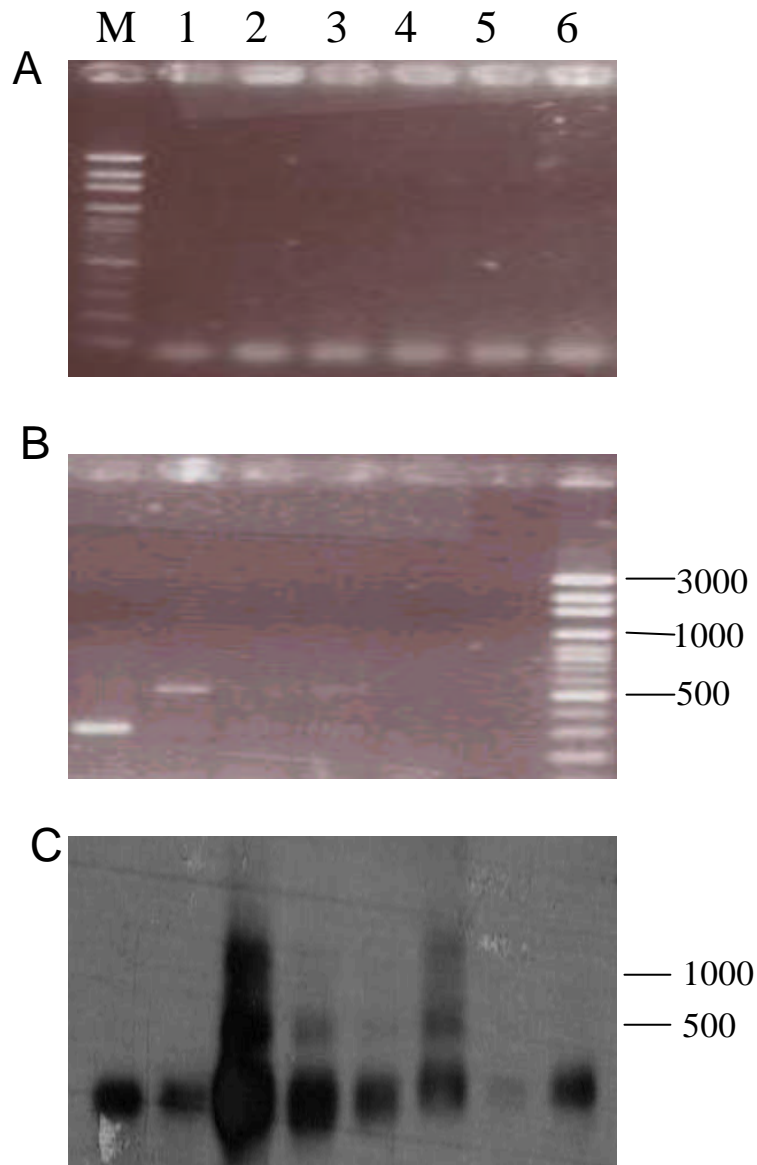
在 3' UTR 發生擴增突變會造成疾病，我們實驗室的初步結果顯示 3' UTR 的(CAG)_n 三聯核酸重複序列的擴增突變的確會造成線蟲動作電位之變化，並使其活動力降低。我們好奇其間是否存有共同之致病機制？或者，所有種類之三聯核酸重複序列擴增突變都會造成線蟲生理變化？利用線蟲作為模式動物，我們或將能更深入了解三聯核酸重複序列擴增後作用機制。



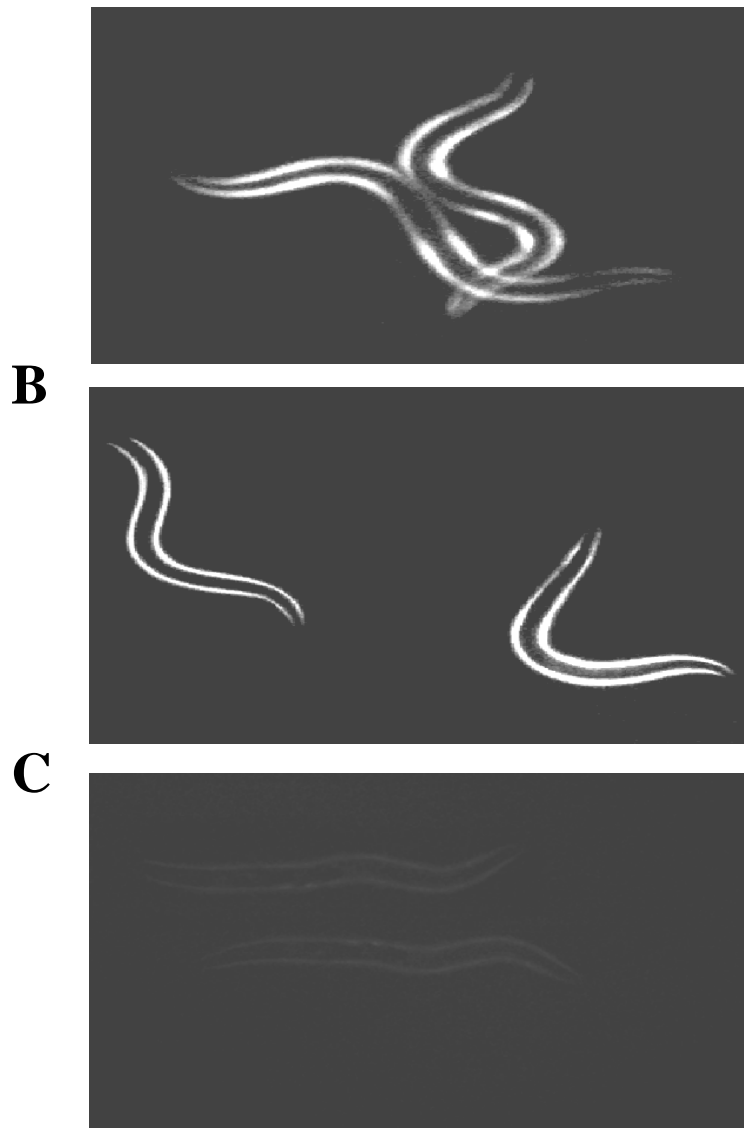
圖一. *myo-3::gfp(CTG)₅* 質體構築



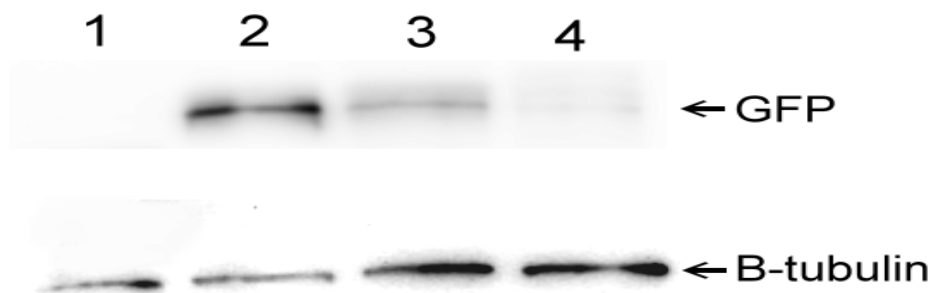
圖二. *myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* 質體構築



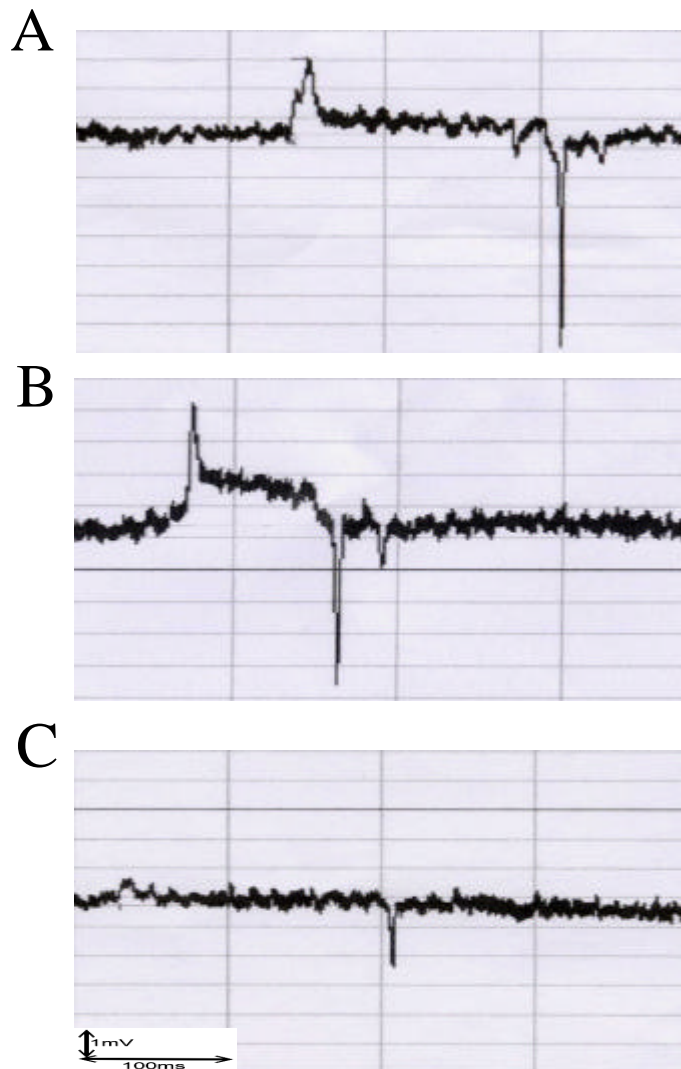
圖三.以PCR或PCR-based Southern blot analysis偵測CTG tract之長度。A、B圖係以 single worm-PCR 進行偵測, *myo-3::gfp*, *myo-3::gfp(CTG)₅*。lanes 1-6代表6隻不同蟲體之DNA測得之結果。圖C係以 (CTG)₁₀ 作為探針, 對含 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 轉殖基因之蟲體進行 PCR-based Southern blot analysis 程序參照 (Hsiao et al. 1999)。



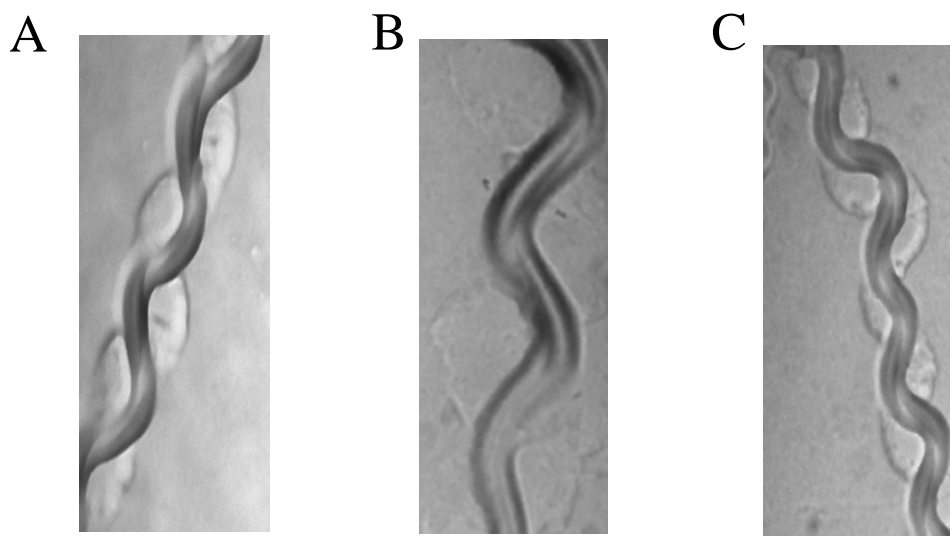
圖四. Transgenic *C. elegans* lines的GFP螢光亮度比較。此圖是L4/adult的線蟲在倒立顯微鏡下所觀察到之結果的代表圖。每一個line總共觀察100隻以上。圖 A、 B、 C、 分別代表 $myo-3::gfp$, $myo-3::gfp(CTG)_5$, 及 $myo-3::gfp(CTG)_{120}$ 線蟲的螢光強度。



圖五. Transgenic *C. elegans* lines GFP蛋白表現量分析。我們利用GFP多株抗體以Western blot偵測各 transgenic *C.elegans* lines GFP之表現量。圖中lanes 1-4分別是lin-15、*myo-3::gfp* line, *myo-3::gfp(CTG)₅* line , 及*myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* lines 。每個lane分別置入 20 μ g 之cell lysate做分析。



圖六. 基因轉殖線蟲電生理分析。圖A、B、C分別代表 $myo-3::gfp$ ， $myo-3::gfp(CTG)_5$ ，及 $myo-3::gfp(CTG)_{120}$ 基因轉殖線蟲肌電圖分析之記錄圖，X軸代表時間(ms)，Y軸代表電壓(mV)。最高波峰及最低波谷分別代表肌肉收縮及舒張時的電位變化。



圖七. Transgenic *C. elegans* lines 蠕動軌跡圖。圖 A、B、C 分別代表 *myo-3::gfp* line , *myo-3::gfp (CTG)₅* line , 及 *myo-3::gfp (CTG)₁₂₀* line 線蟲蠕動之軌跡。

表一 基因轉殖線蟲的咽喉肌電圖結果比較

	Contraction < 2.0 (Poor muscle activity)	Mean Potential (mean ± SE)	Relaxation < 2.2 (Poor muscle activity)	Mean Potential (mean ± SE)
GFP only	0/6 (0%)	2.4±0.2	0/6 (0%)	4.0 ± 0.5
GFP-(CTG) ₅	1/4(25%)	2.6±0.4	0/4 (0%)	3.7±0.6
GFP-(CTG) ₁₂₀₋₃	5/10 (50%)	1.5±0.3*	2/10 (20%)	2.6±0.3*
GFP-(CTG) ₁₂₀₋₇	7/13 (54%)	1.8±0.2	1/13 (7%)	2.9±0.2*
GFP-(CTG) ₁₂₀₋₉	6/7 (86%)	1.4±0.2*	3/7 (43%)	2.3±0.3*

本表的統計分析係使用unpaired Student's test. *代表與GFP only 比較後具P<0.05。

表二 Transgenic *C.elegans* lines 之間活動力*之比較

Transgenic <i>C.elegans</i> lines	mean \pm SE	# P value
GFP only	76 \pm 4.5	
GFP-(CTG) ₅₋₁	75 \pm 3.9	0.85
GFP-(CTG) ₅₋₂	79 \pm 3.1	0.50
GFP-(CTG) ₅₋₃	79 \pm 3.4	0.52
GFP-(CTG) ₁₂₀₋₃	41 \pm 2.4	0.0000002
GFP-(CTG) ₁₂₀₋₇	41 \pm 3.9	0.000002
GFP-(CTG) ₁₂₀₋₉	46 \pm 2.9	0.000004

* 線蟲是以 s 型的方式進行蠕動，線蟲的活動力便是依據線蟲的蠕動次數多寡來判定，即受測線蟲每蠕動一個 s 計數 1，定時 3 分鐘，計數蟲的蠕動次數，每個基因轉殖的 line 各操作 10 隻蟲，其平均值即為 mean 值。

P value 值為各個 line 與 GFP only 的統計分析比值。

參考文獻

- Berul, C. I., Maguire, C. T., Aronovitz, M. J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrman, J., Housman, D., Mendelsohn, M. E., and Reddy, S. (1999) DMPK dosage alternations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J. Clin. Invest.* 103, R1-7
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J.-P., Hudson, T., Sohn, R., Zeman, B., Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Johns, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P. S., Shaw, D. J., and Housman D. E. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799-808.
- Cassata, G., Dozier, C., Burglin, T. R., Kagoshima, H., and Niklaus, G (1999) Function and expression of *ceh-32*, a sine oculis homologue. *International C. elegans Meeting* 279.
- Cummings, C. J., and Zoghbi, H.Y. (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat disease. *Hum. Mol Genet.* 9, 909-916.
- Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H., and Housman, D. E. (1997) Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94 , 7388-7393.
- Fu, Y.-H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., King, J., Jr., Pajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., de Jong, P., Wieringa, B.,

- Korneluk, R., Perryman, M. B., Epstein, H. F., and Caskey, C. T. (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256-1258.
- Hoffman-Radvanyi, H., Lavedan, H., Rabes, J. P., Savoy, D., Duros, C., Johnson, K., and Junien, K. (1993) Myotonic dystrophy: absence of CTG enlarged transcript in congenital forms, and low expression of the normal allele. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1263-1266.
- Heath, S. K., Carne, S., Hoyle, C., Johnson, K. L., and Wells, D. J. (1997) Characterization of expression of *mDMAHP*, a homeodomain-encoding gene at the murine DM locus. *Hum. Mol. Genet.* 6, 651-657.
- Hsiao, K.M., Lin, H. M., Pan, H. C., Li, T. C., Chen, S. S., Jou, S. B., Chiu, Y. L., Wu, M. F., Lin, C. C., and Li, S. Y. (1999) Application of FTA[®] Sample Collection and DNA Purification System on the Determination of CTG Trinucleotide Repeat Size by PCR-Based Southern Blotting. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 13, 188-193.
- Jansen, G., Groenen, P. J., T. A., Bachner, D., Jap, P. H. K., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J. J., Molenaar, P. C., Nederhoff, M. G. J., van Echteld, C. J. A., Dekker, M., Berns, A., Hameister, H., and Wieronga, B. (1996) Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nature Genet.* 13, 316-324.
- Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E. C., Soriano, P., and Tapscott, S. J. (2000) Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nature*

Genet. 25, 105-109.

Korade-Mirnic, Z., Babtizke, P., and Hoffman, E. (1998) Myotonic dystrophy: molecular windows on a complex etiology. *Nucleic Acids Res.* 26, 1363-1368.

Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LP. (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293,864-7.

Mahadevan, M., Tsilfidis, C., sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcero, J., O' Hoy, K., Leblond, S., Earle-Macdonald, J., de Jong, P. J., Wieringa, B., and Korneluk, R. G. (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.

Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C., A. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1772.

Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umnuay P, Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19, 4439-48.

Milne, C. A., and Hodgkin, J. (1999) ETR-1, a homologue of a protein linked to myotonic dystrophy, is essential for muscle development in *Caenorhabditid elegans*. *Current Biology* 9, 1243-1246.

Morrone, A., Pegoraro, E., Angelini, C., Zammarchi, E., Marconi, G., and Hoffman, E. (1997) RNA metabolism in myotonic dystrophy: patient muscle shows decreased insulin receptor RNA and protein consistent

- with abnormal insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 99, 1691-1698.
- Otten, A.D. and Tapscott, S. J. (1995) Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5465-5469.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., and Cooper, T.A. (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.
- Reddy, S., Smith, D. B. J., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., Tran, K., rayburn, H., Bronson, R., Cros D., Balice-Gordon, R. J., and Housman, D. (1996) Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nature Genet.* 13, 325-335.
- Sarker, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., and Reddy, S. (2000) Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nature Genet.* 25, 110-114.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Claude-alain, M. Wattez, A., Vermersch, P., Delacourte, A.(2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum.Mol.Genet.* 10, 2143-55.
- Seznec H., Agbulut O, Sergeant N, Savouret C, Ghestem A, Tabti N, Willer JC, Ourth L, Duros C, Brisson E, Fouquet C, Butler-Browne G, Delacourte A, Junien C, Gourdon G. (2001) Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2717-26.

- Thornton C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., and Moxley, R. T. (1997) Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking *DMAHP* gene. *Nature Genet.* 16, 407-409.
- Timchenko, L.T. and Caskey, C.T. (1996) Trinucleotide repeat disorders in humans : discussions of mechanisms and medical issues. *FASEB J.* 10, 1589-1597.
- Tiscornia G, Mahadevan MS. Myotonic dystrophy: the role of the CUG triplet repeats in splicing of a novel DMPK exon and altered cytoplasmic DMPK mRNA isoform ratios. *Mol. Cell.* 5, 959-967.
- Wang, Y.-H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R. D., and Griffith, J. D. (1994) Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* 265, 669-671.
- Wang, Y.-H. and Griffith, J. (1995) Expanded CTG triplet blocks from the myotonic dystrophy gene create the strongest known natural nucleosome positioning elements. *Genomics* 25, 570-573.
- Wissmann, A., Ingles, J., McGhee J. D., and Mains, P. E. (1997) *Caenorhabditis elegans* LET-502 is related to Rho-binding kinases and human myotonic dystrophy kinase and interacts genetically with a homolog of the regulatory subunit of smooth muscle myosin phosphatase to affect cell shape. *Genes & Dev.* 15, 409-422.