

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Muscleblind 家族蛋白質的功能研究(第3年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2320-B-040-013-MY3
執行期間：99年08月01日至100年07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：碩士班研究生-兼任助理人員：林介玫
 博士班研究生-兼任助理人員：涂麗君
 博士班研究生-兼任助理人員：莊函霓

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 100 年 10 月 31 日

中文摘要： Muscleblind (MBNL)家族蛋白質為一種參與組織特異性 RNA 差異剪輯的調節蛋白。其蛋白質家族共同的特徵在於具有二到四個 CCCH 鋅指區域，並藉由此區域結合 RNA。已知 MBNL 功能的異常在人類會造成肌強直肌肉萎縮症(DM)。本研究欲利用斑馬魚為模式模擬人類 DM 疾病中 MBNL 蛋白質活性下調的情況，探討其對斑馬魚早期發育的影響以了解其功能運作。首先我們選殖出斑馬魚中的三個 muscleblind 同源基因，確認其結構並偵測其在發育時期的表現情形，進一步利用反意 morpholino 寡核苳酸抑制其蛋白質表現，分析受影響的胚胎的表現型和特定基因的表現或差異性 RNA 剪輯。我們的結果顯示，斑馬魚 mbnl 基因藉由 RNA 差異剪輯一共可編碼至少 13 種以上的蛋白質異構物 (4 種 mbnl1，4 種 mbnl2 和 5 種 mbnl3)，它們廣泛表現於斑馬魚的成魚組織，但其特定的剪輯形式於各種組織中具有表現差異性。mbnl1 和 mbnl2 在早期胚胎有母源性表現，而 mbnl3 則只在 24hpf 之後的胚胎才測得到。利用全胚體原位雜交技術觀察，mbnl1 在早期胚胎表現於血液前趨細胞、腹側中胚層，48hpf 後則表現於心臟、咽喉鰓弓、耳囊及魚鰾等組織。mbnl2 的表現分部於眼睛、嗅覺上皮、鰓弓、頭部間葉組織、視神經叉、中/後腦交界、咽喉及魚鰾組織中。mbnl3 在胚胎中呈現廣泛性表現。抑制 mbnl1 蛋白質轉譯可觀察到胚胎心臟形態異常、游動異常、耳石融合、眼睛分化不全、肌肉細胞型態異常、魚鰾以及下顎軟骨缺失。以半定量 RT-PCR 觀察，發現 mbnl1 對於下游基因 tnnt2、mtmr1、vinculin 以及 clcn1 的 RNA 剪輯有異常的調節。而注射 mbnl2 MO 的胚胎，其表型與 mbnl1 knockdown 的胚胎相似，但其嚴重程度較為輕微。使用自製 z-mbnl1 及 z-mbnl2 抗體以西方墨點法偵測蛋白表現，可觀察到 mbnl1 或 mbnl2 蛋白在 morpholino knockdown 的胚胎中其蛋白量有下降。而注射 mbnl1 及 mbnl2 cRNA，統計結果發現可回覆部分上述異常表型。另外，抑制 mbnl3 除了咽喉鰓弓軟骨發育有異常之外並沒有觀察到與 WT 有明顯的差異。反之，顯微注射 mbnl3 cRNA 可造成體軸彎曲及體節縮短，且體節排列嚴重異常。進一步將 zmbnl3 過量表達於小鼠 C2C12 細胞，發現 zmbnl3 會抑制肌肉細胞的分化。由 Dual-luciferase reporter assay 更發現了在斑馬魚胚胎中，mbnl3 可以降低 myoD promoter 的活性，但 mbnl3 本身並不具有轉錄活性。綜合以上結果，mbnl1 或 mbnl2 的缺少可以使斑馬魚胚胎出現與強直型肌肉萎縮症類似的病徵，以及病徵以外的表型，顯示 mbnl 可能參與更多的細胞發育程序，而這些病徵或表型與相關基因的調節及特異性剪接異常有關。mbnl2 的缺失所造成的嚴重程度較 mbnl1 輕微，顯示 mbnl1 在發育期間可能扮演比 mbnl2 更為重要的功能角色。而 mbnl3 對早期胚胎發育功能不明顯，反而

可以經由 MyoD-dependent 途徑來抑制肌肉細胞進行分化。

英文摘要：Muscleblind-like (MBNL) is a family of proteins that participate in regulation of tissue-specific alternative splicing. All of the mbnl proteins contain two to four characteristic CCCH zinc finger domains required for RNA binding. Misregulation of MBNL activity in humans has been shown to cause myotonic dystrophy (DM). This study is aimed to use zebrafish as a system to model the down-regulation of MBNL activity in DM, in which the effect of mbnls on early fish development can be investigated. First, we have cloned three mbnl genes (zmbnl1 – 3) in zebrafish, determined their structures and analyzed the expression profiles during development, and further inhibited their protein translation by injection of anti-sense morpholino oligonucleotides, and analyzed the phenotypes of the morphants and certain gene expression or alternative splicing in morphants. Our result indicated that alternative splicing of the mbnls primary transcripts gives rise to at least 13 protein isoforms (4 mbnl1, 4 mbnl2 and 5 mbnl3). Zebrafish mbnls are expressed in most adult tissues although the expression of specific spliceforms varies. During embryogenesis, mbnl1 and mbnl2 are both maternally expressed but mbnl3 transcripts are not detected until 24hpf. Whole-mount in situ hybridization reveals that mbnl1 is expressed in presumptive blood and ventral mesoderm in early embryos, and in heart, pharyngeal arches, otic vesicle and swim bladder after 48 hpf. mbnl2 is expressed in lens, olfactory epithelium, branchial arches, head mesenchymes, optic chiasm, midbrain hindbrain boundary, pharynx and swim bladder. mbnl3 expression in the embryo is more ubiquitous. Knockdown of mbnl1 results in morphants with deformed heart, abnormal swimming, fused otoliths, less differentiated eyes, defective muscle morphology, swim bladder and arch cartilages. In consistent with the phenotypes, the splicing patterns of four pre-mRNAs (tnnt2, mtmr1, clcn1 and vinculin) that are misregulated in cells with CUG RNA expansion, are altered in the morphants. The phenotype of mbnl2 morphants is similar with that of mbnl1 but milder. Western blotting reveals reduction of mbnl1 and mbnl2 protein levels in corresponding knockdown embryos. Injection of mbnl1 and mbnl2 cRNA can rescue partial phenotypes observed in the morphants. On the other hand, antisense knockdown of mbnl3 did not result in embryos with clear difference from WT embryos except defects in the pharyngeal cartilages.

目錄

中文摘要.....	p1
英文摘要.....	p2
前言與研究目的	
MBNL 的基因結構.....	p4
MBNL 的基因表現及蛋白質功能.....	p4
異常的 MBNL 功能可導致疾病.....	p5
研究目的.....	p6
結果與討論	
斑馬魚 muscleblind 基因之選殖和序列分析.....	p7
<i>zmbnl</i> 基因的表現.....	p7
Morpholino knockdown 後的表型觀察.....	p8
游動行為與肌肉型態異常.....	p8
心臟發育異常.....	p9
其他部位的發育缺失與異常.....	p10
<i>Mbnl1</i> 調節下游基因 splicing 的情形.....	p10
異常表型的回復.....	p11
<i>zmbnl3</i> 過量表達後造成胚胎體節不正常排列.....	p12
<i>zmbnl3</i> 抑制 C2C12 細胞分化.....	p12
<i>zmbnl3</i> 間接抑制 <i>myoD</i> promoter 的活性.....	p12
圖一 ~ 圖十七.....	p13 ~ p25
計畫成果自評.....	p26
參考文獻.....	p26

一、中文摘要

Muscleblind (MBNL) 家族蛋白質為一種參與組織特異性 RNA 差異剪輯的調節蛋白。其蛋白質家族共同的特徵在於具有二到四個 CCCH 鋅指區域，並藉由此區域結合 RNA。已知 MBNL 功能的異常在人類會造成肌強直肌肉萎縮症(DM)。本研究欲利用斑馬魚為模式模擬人類 DM 疾病中 MBNL 蛋白質活性下調的情況，探討其對斑馬魚早期發育的影響以了解其功能運作。首先我們選殖出斑馬魚中的三個 *muscleblind* 同源基因，確認其結構並偵測其在發育時期的表現情形，進一步利用反意 morpholino 寡核苷酸抑制其蛋白質表現，分析受影響的胚胎的表現型和特定基因的表現或差異性 RNA 剪輯。我們的結果顯示，斑馬魚 *mbnl* 基因藉由 RNA 差異剪輯一共可編碼至少 13 種以上的蛋白質異構物 (4 種 *mbnl1*，4 種 *mbnl2* 和 5 種 *mbnl3*)，它們廣泛表現於斑馬魚的成魚組織，但其特定的剪輯形式於各種組織中具有表現差異性。*mbnl1* 和 *mbnl2* 在早期胚胎有母源性表現，而 *mbnl3* 則只在 24hpf 之後的胚胎才測得到。利用全胚體原位雜交技術觀察，*mbnl1* 在早期胚胎表現於血液前趨細胞、腹側中胚層，48hpf 後則表現於心臟、咽喉鰓弓、耳囊及魚鰾等組織。*mbnl2* 的表現分部於眼睛、嗅覺上皮、鰓弓、頭部間葉組織、視神經叉、中/後腦交界、咽喉及魚鰾組織中。*mbnl3* 在胚胎中呈現廣泛性表現。抑制 *mbnl1* 蛋白質轉譯可觀察到胚胎心臟形態異常、游動異常、耳石融合、眼睛分化不全、肌肉細胞型態異常、魚鰾以及下顎軟骨缺失。以半定量 RT-PCR 觀察，發現 *mbnl1* 對於下游基因 *tnnt2*、*mtmr1*、*vinculin* 以及 *clcn1* 的 RNA 剪輯有異常的調節。而注射 *mbnl2* MO 的胚胎，其表型與 *mbnl1* knockdown 的胚胎相似，但其嚴重程度較為輕微。使用自製 *z-mbnl1* 及 *z-mbnl2* 抗體以西方墨點法偵測蛋白表現，可觀察到 *mbnl1* 或 *mbnl2* 蛋白在 morpholino knockdown 的胚胎中其蛋白量有下降。而注射 *mbnl1* 及 *mbnl2* cRNA，統計結果發現可回覆部分上述異常表型。另外，抑制 *mbnl3* 除了咽喉鰓弓軟骨發育有異常之外並沒有觀察到與 WT 有明顯的差異。反之，顯微注射 *mbnl3* cRNA 可造成體軸彎曲及體節縮短，且體節排列嚴重異常。進一步將 *zmbnl3* 過量表達於小鼠 C2C12 細胞，發現 *zmbnl3* 會抑制肌肉細胞的分化。由 Dual-luciferase reporter assay 更發現了在斑馬魚胚胎中，*mbnl3* 可以降低 *myoD* promoter 的活性，但 *mbnl3* 本身並不具有轉錄活性。綜合以上結果，*mbnl1* 或 *mbnl2* 的缺少可以使斑馬魚胚胎出現與強直型肌肉萎縮症類似的病徵，以及病徵以外的表型，顯示 *mbnl* 可能參與更多的細胞發育程序，而這些病徵或表型與相關基因的調節及特異性剪接異常有關。*mbnl2* 的缺失所造成的嚴重程度較 *mbnl1* 輕微，顯示 *mbnl1* 在發育期間可能扮演比 *mbnl2* 更為重要的功能角色。而 *mbnl3* 對早期胚胎發育功能不明顯，反而可以經由 MyoD-dependent 途徑來抑制肌肉細胞進行分化。

關鍵詞：Muscleblind、斑馬魚、基因表現、全胚胎原位雜交、RNA 差異剪輯

ABSTRACT

Muscleblind-like (MBNL) is a family of proteins that participate in regulation of tissue-specific alternative splicing. All of the *mbnl* proteins contain two to four characteristic CCCH zinc finger domains required for RNA binding. Misregulation of MBNL activity in humans has been shown to cause myotonic dystrophy (DM). This study is aimed to use zebrafish as a system to model the down-regulation of MBNL activity in DM, in which the effect of *mbnls* on early fish development can also be investigated. We cloned three *mbnl* genes (*mbnl1–3*) in zebrafish, determined their structures and analyzed the expression profiles during development, and further inhibited their protein translation by injection of anti-sense morpholino oligonucleotides, and analyzed the phenotypes of the morphants and certain gene expression or alternative splicing in morphants. Our results indicate that alternative splicing of the *mbnls* primary transcripts gives rise to at least 13 protein isoforms. Zebrafish *mbnls* are expressed in most adult tissues but the expression of specific spliceforms varies. During embryogenesis, *mbnl1* and *mbnl2* are both maternally expressed but *mbnl3* transcripts are not detected until 24hpf. Whole-mount *in situ* hybridization reveals that *mbnl1* is expressed in presumptive blood and ventral mesoderm in early embryos, and in heart, pharyngeal arches, otic vesicle and swim bladder after 48 hpf. *mbnl2* is expressed in lens, olfactory epithelium, branchial arches, head mesenchymes, optic chiasm, midbrain hindbrain boundary, pharynx and swim bladder. *mbnl3* expression in the embryo is more ubiquitous. Knockdown of *mbnl1* results in morphants with deformed heart, abnormal swimming, fused otoliths, less differentiated eyes, defective muscle morphology, swim bladder and arch cartilages. In consistent with the phenotypes, the splicing patterns of four pre-mRNAs (*tnnt2*, *mtmr1*, *clcn1* and *vinculin*) that are misregulated in cells with CUG RNA expansion, are altered in the morphants. The phenotype of *mbnl2* morphants is similar with that of *mbnl1* but milder. Western blotting reveals reduction of *mbnl1* and *mbnl2* protein levels in corresponding knockdown embryos. Injection of *mbnl1* and *mbnl2* cRNA can rescue partial phenotypes observed in the morphants. On the other hand, antisense knockdown of *mbnl3* did not result in embryos with clear phenotype except defects in the pharyngeal cartilages. On the contrary, microinjection of *mbnl3* cRNA into the embryos resulted in defective embryos with crooked body axes and short, disorganized somites. When introduced into C2C12 cells, *mbnl3* is able to inhibit muscle cell differentiation. Dual-luciferase reporter assay further reveals that *mbnl3* down-regulated *myoD* promoter activity in fish embryos. However, *mbnl3* does not possess transactivation activity. Taken together, depletion of *mbnl1* and *mbnl2* in zebrafish embryos can recapitulate, but not restricted to, the pathological phenotype observed in DM patients, suggesting *mbnl* proteins may participate in additional cellular processes in relation to development. Regulation of gene expression or alternative splicing of certain genes is involved in the pathological

phenotype formation. mbnl2 may play a minor role than mbnl1 during fish development as it causes milder effects, whereas mbnl3 does not play a key role in early development, instead, mbnl3 may inhibit muscle differentiation through the MyoD-dependent pathway.

KEYWORDS: muscleblind, zebrafish, gene expression, whole-mount in situ hybridization, RNA alternative splicing

二、 前言與研究目的

在生物體發育過程中須依靠基因的轉譯及後修飾作用，而特異性剪輯作用 (Alternative splicing) 會形成不同的蛋白質異構物，以輪流替換進行一連串的生化路徑，經過分化、cell fate 的決定與凋亡等，逐漸發展成一個完整的生物體。目前已知當特異性剪輯作用異常時，將會導致細胞的癌化、轉移和一些遺傳疾病[1]，例如：spinal muscular atrophy、myotonic dystrophy 以及 retinitis pigmentosa。其中已知在肌強直肌肉萎縮症中，造成其下游基因錯誤剪接的原因與 muscleblind 蛋白質的活性改變有關。

MBNL 的基因結構

Muscleblind (MBNL) 為一個可與細胞核內RNA結合的蛋白質家族，且具有調控特異性RNA差異性剪接的功能[2,3]。其典型的結構為含有一至兩對Zinc-finger domains，此 domain 包含三個Cys及一個His (稱為CCCH domains)，此功能區在各物種間的保留度相當高。在脊椎動物的Mbnl同源基因此區域是以CX7CX6CX3H 和 CX7CX4CX3H的zinc finger型式存在，已知此類型的CCCH domain可調節鋅離子以及結合特殊的RNA序列[4]。在許多物種的某些蛋白中亦發現相似的功能區，其cysteine的間距卻不相同，例如老鼠的TTP(tristetraprolin)[5]、斑馬魚的Non-arches[6]以及果蠅的Clipper[7]等，這些蛋白與解除mRNA的穩定性或切除RNA hairpins有關。由文獻資料顯示，於Mbnl中CCCH domain可穩固其蛋白質與RNA結合的穩定性，並且參與調控 RNA的代謝。不同物種的mbnl雖然皆高度保留了上述結構，但其數目並不相同，較低等的動物含有較少的Zinc-finger domain[8]，例如線蟲只含有一對。

脊椎動物mbnl同源基因中除了與RNA鍵結有關的Zinc-finger功能區之外，在其第一個CCCH domain之前含有一WLXLEV胺基酸序列(X指任何胺基酸)，稱之為LEV box；而第二個Zinc-finger domains則與NGR胺基酸序列連結而成，且其前後通常連結一個valine或者asparagine這種非極性側鏈，然而這些box或者特殊序列的功能目前還未知。此外，在coding region尾端還包含Ala-rich的功能區，此Ala-rich區域已被證實為AUF1 (一種RNA-binding蛋白) 高親合性地鍵結在其辨認序列A + U-rich elements[9]，且和此蛋白質的dimerization及參與蛋白質-蛋白質之間的交互作用有關。某些特殊序列於各物種間也有差異性，例如部分人類Mbnl同源基因(HsMBNL2, HsMBNL3)含有proline-rich domain，此功能區與蛋白質間的交互作用有關[10]；而果蠅的MblB則發現含有phenylalanine-rich區域，其功能目前還未知。Muscleblind 在部分物種間也保留了serine/threonine (CK2 and PKC)磷酸化區域，這可能為誘導細胞外訊息傳遞路徑的結合位置[11]。

MBNL的基因表現及蛋白質功能

Muscleblind最早於果蠅中被選殖出，一共含有四種蛋白質異構物，分別為MblA、MblB、MblC及MblD。除了具有nuclear localization的特性[12]，其表現位置分布於各個時期與組織中，例如：胚胎發育中/後期的咽喉部、調節果蠅生理節奏行為的神經原細胞(Bolwig organ)以及感光接受器(terminal photoreceptor)等。Mbl在果蠅發育早期眼睛的

分化過程中也有明顯表現，若*mbl*突變會造成terminal photoreceptor功能上的異常[12]。此外，Mbl也參與了肌原細胞的分化，有文獻指出果蠅Mbl可能為Myocyte enhancer factor 2 (MEF-2) family 所引發的肌肉分化路徑的下游[13]。在缺少*mbl*的果蠅中發現其肌肉功能異常、腹部過度收縮(hypercontraction)，以及肌纖維上Z線有明顯的缺失[13]。

在無脊椎動物中的*muscleblind*只有一種同源基因paralog[2]，例如線蟲(*C. elegans*)。線蟲*muscleblind*基因有兩種剪接形式：*CeMbl-a* 與 *CeMbl-b*，其中各包含兩個Zinc-finger domain[8]。而Ala-rich的部分只有發現於*CeMbl-a*，但是否會影響CeMBL與RNA的鍵結或影響蛋白間的交互作用，至今仍不清楚。不同於果蠅*muscleblind*在發育期間的重要性，CeMBL於線蟲幼蟲時期的表現並不明顯[8]。在給予RNAi抑制*CeMbl*基因表現的成蟲中可發現，其生殖腔附近有腫大的情形而導致其生育能力下降。此外，*CeMbl*(RNAi)線蟲也有異常的肌肉型態，利用anti-*vinculin*作組織免疫染色發現其dense body的斷裂，而導致線蟲的爬行速率減慢及軌跡異常[8]。

在老鼠中發現有三個*muscleblind-like*基因，分別為 *Mbnl1*、*Mbnl2*、*Mbnl3*，其個別可因RNA剪輯而有三到六種的蛋白質異構物。*Mbnl1*在心臟發育期間的表現量最多，肌肉其次，其他組織也有表現；*Mbnl2*則在大多多的組織中均有表現；而*Mbnl3*表現多在胚胎發育期間，成鼠組織中的表現量較低[14]。而此三型在組織表現部位主要為頭部的區域，包括first branchial arch 的maxillary components、耳囊、神經管、心臟、四肢、橫隔和舌頭等[14]。在*mbnl*剔除的小鼠中發現，除了有肌纖維紊亂、肌肉無力和白內障等症狀外，其*mbnl*下游基因的剪接也發生異常情形[15]。此外，在鼠科動物的前脂肪細胞(3T3-F442A)中發現，當細胞開始初步分化與終端分化期間，生長荷爾蒙(growth hormones)會促進*Mbnl2*的大量表現[16]。這表示*Mbnl2*可能參與了脂肪組織的新生與代謝。

至於在人類中則與老鼠有相似的同源基因，分別為MBNL(*MBNL1*)、MBLL(*MBNL2*)和MBLX(*MBNL3*)三種，目前已知個別有三到九種的蛋白質異構物[2]。其表現情形與老鼠相似：*MBNL*促進早期肌肉的分化多表現於心臟與骨骼肌；*MBLL*則與RNA-dependent integrin $\alpha 3$ protein localization有關[17]，表現於大部分組織並且有大致相當的表現量；*MBLX*的表現則明顯較少，且與抑制肌肉分化有關[18]。此外，*MBNL*、*MBLL*和*MBLX*與肌強直型肌肉萎縮症Myotonic dystrophy (DM)的致病機制有相當大的關聯，其蛋白質會與核內擴增的三聯核酸重複序列結合形成RNA foci，使其正常功能喪失[19]。

異常的 MBNL 功能可導致疾病

肌強直型肌肉萎縮症是一種多系統退化性疾病，典型的症狀為：骨骼肌的肌強直(過度伸直不易放鬆)、肌肉軟弱無力、心律不整、白內障以及胰島素耐受不良(糖尿病)等[20,21]。DM分為DM1跟DM2兩型，DM1主要為第19對染色體上DMPK基因的3'-UTR區的CTG重複序列產生擴增突變所導致；而DM2則是在第3對染色體上*ZNF9* intron 1的CCTG擴增異常[21]。雖然這兩型DM是在不同基因座上發生CTG或CCTG重複序列擴增突變，但其臨床特徵皆相同，而且所轉錄出來擴增突變的RNA都會在核內形成RNA

foci。目前已知其致病機轉與MBNL有關，擴增的CUG/CCUG RNA序列會結合MBNL蛋白，使其滯留於核內[22]。DM所呈現的病徵都與MBNL下游基因的異常剪接有關，例如：*cardiac troponin T (cTNT)*、*myotubularin-related protein 1 (MTMR1)*以及*chloride channel 1 (Clcn-1)*。

cardiac troponin T 大多表現於心臟，尤其在早期參與心臟發育時looping的過程[23]，DM的細胞模式上發現cTNT有剪接異常的情形，由於此基因剪接異常，因而造成DM病人有心臟導傳異常。而*myotubularin-related protein 1*與myogenesis有關，且在此時期的MTMR1便有明顯不同的基因剪接型式。在DM疾病模式的老鼠以及DM病人的細胞中，也發現*mtmr1*基因有差異性剪接失常的現象[24]。此外，近期在*CeMbl* knockdown的線蟲中發現，其肌纖維中dense body的斷裂的情形，似乎和*vinculin*有關[8]。Vinculin是一種肌動蛋白上的粘合分子為dense body的一部份，metavinculin為其另一種蛋白質異構物。在肌原母細胞分化後，metavinculin的表現量與vinculin趨向於相等，以幫助vinculin執行黏合Z線與細胞基質的功能[25]。以上兩種與肌肉構成相關的基因(*mtmr1*與*vinculin*)的異常，可能與DM病人中所出現的肌肉萎縮和肌肉束紊亂等病理有關。而DM疾病典型的肌強質症狀中，已證實為氯離子通道(chloride channel)的結構異常所引起。在DM病人的骨骼肌中，其Clcn-1 mRNA包含未被剪輯掉的exon 2、exon 7a以及exon 8a，這些exon序列帶有in-frame的終止密碼，而導致CLCN1蛋白質長度縮短及domain缺失，並且喪失正常功能。失調的氯離子通道不斷開啟、不斷放電，而造成肌肉持續收縮無法放鬆的現象(肌強直)[26]。

研究目的

先前許多文獻皆顯示 *muscleblind* 在肌強直肌肉萎縮症中的重要性，但是在生物發育的過程中其功能的探討，目前只見於果蠅和線蟲，而小鼠的研究則集中於DM疾病的致病機轉上。如前所述，RNA 差異性剪輯在維持細胞正常分化上扮演相當重要的角色，因此調節 RNA 差異性剪輯之蛋白質必然在生物體的發育上也具有重要功能。本實驗目的在利用斑馬魚系統為模式動物，探討 *muscleblind* 在發育過程中的表現情形及其蛋白質功能。另外藉由抑制 *muscleblind* 的活性分析其表型，看是否可以模擬人類疾病的病徵，建立一個簡單的疾病模式以供後續的研究。

斑馬魚(*Danio rerio*)為一種熱帶魚，除了不占太大空間，飼養也較為容易。此外，其世代週期短(只需三個月)，短時間內即可發育至性成熟，且子代數目多。而斑馬魚胚胎呈現透明狀，發育中的每一過程皆可在體外觀察，方便操作顯微注射等實驗。且因其具有已被解碼的基因圖譜等有利條件，非常適合作為研究基因遺傳及發育調控的模式動物。

我們從成魚卵巢 RNA 中選殖出三個 *muscleblind* 的同源基因，分析這些基因的結構及其使用全胚胎體原位雜交技術來觀察其基因於發育時期不同時間與空間上的表現模式。利用 antisense morpholino 顯微注射的 loss-of-function 方式，探究其在脊椎動物發育過程所參與的組織產生的變化，以及其所調控的其他基因的表現或差異性剪輯的改變。

三、結果與討論

斑馬魚muscleblind基因之選殖和序列分析

我們從斑馬魚成魚卵巢RNA中選殖出三個muscleblind的同源基因，分別命名為*z-mbnl1*、*z-mbnl2*以及*z-mbnl3*，經由RT-PCR及RACE PCR定序分析，發現這些*z-mbnl*基因皆可藉由差異性RNA剪輯，而製造出多種蛋白質異構物，我們已確定的序列至少共有13種，包括*z-mbnl1A-D*、*z-mbnl2A-D*及*z-mbnl3A-E*(圖一)。這些序列已送至NCBI資料庫中登錄。由序列觀察分析(圖二)，除了*z-mbnl2A*及*z-mbnl2D*只包含兩個zinc finger domain外，其餘均含有四個zinc finger domain(CCCH finger1-4)，並且也含有LEV box和NGR box等其他可幫助蛋白辨認RNA序列的motif。此外，也發現具有和蛋白質與蛋白質間交互作用有關的Ala-rich region。利用演化樹分析及與各物種比對，發現在脊椎動物中的mbnl蛋白質皆有相當高的相似度，且斑馬魚與老鼠和人類一樣都具有三種同源基因。

z-mbnl 基因的表現

為了瞭解*z-mbnl* RNA transcripts 在斑馬魚胚胎各個階段以及成魚各個組織的表現情形，我們首先利用 RT-PCR 實驗來觀察(圖三)。在成魚組織中 *z-mbnl1* 表現在眼睛、肌肉、心臟、卵巢、腦、精囊、皮膚、魚鰓及魚鰾等，除了在肌肉、心臟與精囊其 *z-mbnl1A/B* form 表現量較多之外，其餘組織都有四種 isoform 的表現。*z-mbnl2* 則在卵巢、腦、精囊、皮膚與魚鰓表現較多且四種 form 皆有表現。*z-mbnl3* 在成魚大部份組織都有表現，但不同 isoforms 在不同成魚組織有表現差異。在發育時期上，*z-mbnl1* 於早期 1.5 到 3hpf 即開始表現，此時期表現以 1D、A/B 的 isoform 為主，推測為 maternal gene transcript。zygotic *z-mbnl1* gene 從 24hpf 才逐漸明顯產生，此時 1C form 也開始表現出來。至於 *z-mbnl2* 的表現也可看出有 maternal 和 zygotic 表現的趨勢，在 3hpf 前和 14hpf 後都可偵測到其表現。早期以 2C、2A form 較為明顯，2B、2D form 於 14~24hpf 才開始表現出來。*z-mbnl3* 在早期(≤24hpf)幾乎不表現，24hpf 後也只有 3A 和 3C isoforms。

以全胚胎原位雜交觀察 *z-mbnl1* 於空間與時間上的表現位置(圖四)，我們發現在 16hpf 時期 *z-mbnl1* 表現於血液前趨細胞(presumptive blood)、腹側中胚層(ventral mesoderm)，在 24hpf 時期則在 blood vessels 和 blood island 有專一性的表現。並利用 two color double staining 以 *hbae1*(hemoglobin alpha embryonic-1)作為 marker 觀察是否與 *z-mbnl1* 同時表現於 blood island。以 NBT/BCIP 呈現藍色代表 *z-mbnl1* 表現位置，以 FastRed 呈現紅色代表 *hbae1* 表現位置，結果發現兩者表現位置皆呈現在 blood island 並顯示為紫色，表示 *z-mbnl1* 在 24hpf 可能參與 presumptive blood 的形成。爾後 48~120hpf 則分布表現於心臟(heart)、咽喉鰓弓(pharyngeal arches)、耳囊(otic vesicle)、魚鰾(swim bladder)及下顎(branchial archs)等組織。在全胚胎原位雜交實驗中發現 120hpf 以前，*z-mbnl1* 在肌肉細胞上的表現並不明顯。因此我們取出 24-120hpf 時期之胚胎的肌肉組織，並避開 blood vessels 和 blood island 位置，純化其 total RNA 並利用 RT-PCR 觀察 *z-mbnl1* 的表現情形，結果顯示在 24-120hpf 時期 *z-mbnl1* 皆有高度表現。

而 *z-mbnl2* 的部分，發現在 24hpf 時 *z-mbnl2* 即明顯表現於眼球(lens)及嗅覺上皮細胞(olfactory Epithelium)、36hpf 至 48hpf 期間則表現在耳囊(otic vesicle)、endodermal

pouch 和視覺交叉神經(optic chiasm)等處顯示其表現皆集中於頭部；到了 72hpf 之後發現於中/後腦交界(midbrain hindbrain boundary)、魚鰾(swim bladder)及下顎(branchial archs)也有明顯的表現量。*z-mbnl3* 在胚胎的表現並無非常顯著的特定位置，但在頭部周圍有發現較強的訊號。

Morpholino knockdown 後的表型觀察

我們以顯微注射 anti-sense morpholin 來抑制 *z-mbnl* mRNA 轉譯成蛋白質，在注射後 24hpf 至 5dpf 觀察胚胎(morphants)發育的表型，藉此了解 *z-mbnl1* 在斑馬魚胚胎發育中可能的功能。*z-mbnl1* 設計了兩種 morpholino，包括結合至 intron 3 及 exon 4 之間抑制 mRNA splicing 的 MO1，以及互補於轉譯起始點附近的 MO2。由於 MO2 的 dose-dependent 現象不明顯，因此以下實驗大部分以 MO1 morphants 為研究表型異常型態的主要來源。*Zmbnl2* 的 MO 在轉譯起始點，*zmbnl3* 的 MO 設計在轉譯起始點上游(-6~-30bp)的位置，可以同時抑制 5 種 isoforms 的轉譯。

利用顯微注射在胚胎受精後一個細胞時期分別給予 4、8ng/embryo 的 *z-mbnl1* 或 *z-mbnl2* MO，再與 wild type 以及 Standard Control 作比較觀察(圖五)。*z-mbnl1* morphants 在 24 hpf 時相對於 WT 其腦部較小且發育較為緩慢；到了 48 hpf 其靠近靜脈竇的部位稍微腫起且眼睛輪廓較小，在此時 WT 幼魚已經可以自行脫出卵膜並且向前游行，而異常表型的幼魚大多無法順利脫出卵膜；72 hpf 則出現心臟呈管狀、心臟跳動和血流緩慢、下顎發育不完整以及尾部彎曲等表型，其中還有 circular swimming 或者無力游動的情形；直至胚胎發育至 5 dpf 後甚至出現腹腔水腫、魚鰾消失、血液循環和心臟跳動更為薄弱，而胚胎通常無法存活超過 6 天。*z-mbnl2* morphants 在 24hpf 時胚胎表型沒有明顯的異常情形；至 48hpf 則與 *z-mbnl1* morphants 一樣均有腦部及眼睛變小的缺失；到了 72hpf 之後心臟萎縮、血液循環變慢、下顎以及魚鰾也有缺失，但相較起來其表型都比較輕微。而 circular swimming 的比例也比 *z-mbnl1* morphants 少。注射 *zmbnl3*-MO 與注射 STD 的胚胎 24 hpf 的存活率並無顯著的差別。在 72 hpf 存活的胚胎裡，大部分胚胎外表型正常，少數可以觀察到頭部偏小、心包膜及靜脈竇腫脹、眼睛小的 mild 表型，及眼睛發育不全、體軸較為彎曲、下顎有缺陷及腹腔腫脹等 moderate 表型。以基因標記作原位雜交分析，*zmbnl3* knock down 的胚胎在腦部、心臟和魚鰾並無發現發育上的異常但有咽喉鰓弓之軟骨構造發育上的異常

為證明 anti-sense MO 的效力，我們設計一對在 exon 1 與 exon 4 上的 primers，利用 RT-PCR 比較 *z-mbnl1* MO1 morphants 與 Control 其 exon 4 inclusion 的情形。結果顯示 *z-mbnl1* morphants 的 RNA 表現量明顯下降。另外 MO2 的效力則由它可使 *mbnl1* promoter fused luciferase 活性下降證明(圖六)。

游動行為與肌肉型態異常

為了得知 *z-mbnl1* knockdown morphants 肌肉功能是否受影響，我們依 slow muscle 與 fast muscle 在不同時期主導胚胎游動之特性分別觀察之。在 24hpf 之胚胎其尾部會自發性如鐘擺般左右擺動，WT 與 Standard Control 之胚胎其擺動情形正常且幅度較大，擺

動次數與頻率在30秒內較高。而*z-mbnl1* morphants則出現不正常抖動，擺動幅度小且頻率較低。此時期胚胎肌肉運動行為主要為slow muscle所控制，因此我們利用免疫組織染色以anti-F-59標定slow muscle，發現24hpf時slow muscle在WT與Standard Control之胚胎排列平整的覆蓋於myotome表層，myotome之間格與大小一致，直到胚胎尾端才逐漸縮短。而*z-mbnl1* knockdown morphants則出現slow muscle較細且排列紊亂，myotome較短且出現零星的小空洞(圖七A)。在48hpf時上述情形則更為嚴重，*z-mbnl1* knockdown morphants其slow muscle呈現波浪狀。在48hpf時我們利用針頭碰觸胚胎軀幹，WT與Standard Control之胚胎在接收到刺激後便快速的向前游動(burst swimming)，而*z-mbnl1* knockdown morphants在接收到刺激時分為三種情形：第一種是在30秒內碰觸數次morphants皆毫無反應；另一種情形則是碰觸後輕微或劇烈抖動，但是無法正常游向前；最後一種則是可以緩慢的游向前進。此時其控制胚胎活動除了slow muscle還有fast muscle，因此我們以myh2 (myosin, heavy polypeptide 2) probe做原位雜交，觀察48hpf其fast muscle的型態是否異常(圖七B)。正常情況下，slow muscle migration完成後促使fast muscle elongation，並平均覆蓋於myotome深層且較slow muscle厚實，且靠近yolk之myotome其myl2有較高的表現量。而*z-mbnl1* knockdown morphants其myl2表現多半集中在myotome與myotome之間的boundary，且myotome中myl2表現分散不均表現量較低，由此情形判斷其fast muscle可能並未完成elongation，或其過程出現異常。另外，我們也利用phalloidin可專一性結合F-actin並且將之染成螢光紅的特性觀察5dpf的胚胎(圖八)。此時期WT胚胎肌肉組織發育較完整，因此可以看到其尾部的肌肉束排列整齊且較為密集；而*z-mbnl1* knockdown的胚胎則肌肉束較少、有萎縮及紊亂的現象，還有空洞的肌肉組織，顯示在尾部的肌肉發育較不完整。

心臟發育異常

cmlc (cardiac myosin light chain)為表現於心臟的基因，在24hpf時原本管狀的心臟經由looping的動作將漸漸形成右旋的球狀，而在此期間*cmlc*大量表現於心室與心房。以此基因作為marker可觀察到*z-mbnl1* morphants於48 hpf時心臟發育呈現狹長狀。而在72hpf時期則可見*z-mbnl2* morphants心臟已包覆為球體，*z-mbnl1* morphants依然停留於管狀的心臟型態。從組織切片與H&E染色觀察，96hpf的WT胚胎其心臟分為心室與心房兩個空腔，並且其中央的瓣膜組織清晰可見，已經發育完成為一個完整的器官。*z-mbnl1* knockdown的胚胎則不見此情形，在相同於WT心臟的部位，只見其環型組織而不見完整心臟構造，顯示其似乎還停留在未looping完成前的管柱狀(圖九G-K)。

此外，心臟發育除了結構上的異常，我們也發現在48hpf時*z-mbnl1* knockdown morphants出現錯誤的左旋looping。因此我們利用全胚胎雜交觀察16hpf時其cardiac core上BMP(bone morphogenetic protein 4)的訊號表現，在胚胎22 somites時cardiac core上BMP的訊號移動將決定heart tube "jog"的方向。WT與Standard Control之胚胎其cardiac core上BMP的訊號聚集在左側(dorsal view, 頭朝上)，而無論是*z-mbnl1* morpholino1或morpholino2 morphants則有33.3%與44.4%的胚胎其cardiac core上BMP的訊號聚集在右側(圖九A-C)。

其他部位的發育缺失與異常(圖十)

咽喉鰓弓異常: 利用可針對軟骨染色的 Alcian blue staining 分析在 5dpf 時咽喉鰓弓的軟骨構造, 正常斑馬魚胚胎的咽喉鰓弓軟骨於第五天時已發育完全, 七對 pharyngeal arch 也已清晰可辨; 然而 *z-mbnl1* morphants 軟骨發育幾乎停滯, 除了部份胚胎還保留形狀變異的 Meckel's cartilage 與 ceratobranchial cartilages, 其他部分則完全不見; 相較起來 *z-mbnl2* morphants 下顎軟骨則較為完整, 除了 Meckel's cartilage 縮短、ceratohyal Cartilage 角度異常、ceratobranchial cartilages 1-5 節都還有發育出來。

耳石異常: *z-mbnl1* morphants circular swimming 的行為顯示其平衡系統可能有異常。正常斑馬魚胚胎的 otic vesicle 有兩顆耳石, 前端耳石較小且呈現橢圓狀, 而後端較大的耳石則呈圓型, 此外還可以清楚看到三個半規管向中央集中成一個三角丘。觀察 *z-mbnl1* morphants 發現其兩顆耳石靠近或融合的現象, 而其半規管與三角丘則模糊不見, 顯示其聽覺及平衡系統可能受到影響。

魚鰾的缺失: *anxa5* 除了在 5dpf 可專一性表現於魚鰾外, 還可在胚胎嗅覺上皮看到其表現。因此我們用此基因作為觀察魚鰾的 gene marker, *z-mbnl1* morphants 於 5dpf 時魚鰾缺陷且幾乎完全消失。

眼睛分化異常: 我們取 96hpf 的胚胎作組織包埋及切片, 並與 wild type 作比較。切片後的組織給予 Hematoxylin and Eosin 染色以觀察細胞的型態及排列分布情形。正常的眼睛其視網膜分化由外而內可分為五層: Rods and Cones、outer plexiform layer、bipolars、inner plexiform layer 以及 ganglion cell layer, 在 96hpf 的胚胎橫切片或縱切片組織染色中, 發現 *z-mbnl1* knockdown 都導致眼睛輪廓變小且 morphants 的眼睛分化分層不明顯, 眼球的方向朝下。

血液前驅細胞減少: 我們利用 *hbae1*(hemoglobin alpha embryonic-1)作為 marker 觀察 *z-mbnl1* knockdown 後, 其 presumptive blood 是否有異常。結果發現, WT 胚胎在 24hpf 時 presumptive blood 分布在 blood vessels 至 blood island 聚集, 且沿著兩側腹部擴散至心臟匯集。而 *zMbnl1* knockdown morphants 雖然有相同的分布情形, 但 *hbae1* 表現量明顯較低, 尤其在 blood island 聚集量較為稀少。

Mbnl1 調節下游基因 splicing 的情形 (圖十一)

Tnnt2 正常胚胎 *Tnnt2* (*Cardiac troponin T*) 基因表現於早期 somitogenesis (10 hpf) 以及 cardiogenesis (14 hpf), 以 unspliced form 為主, 以我們設計的 primer 去做 PCR 其長度為 220 bp。48hpf 後開始慢慢出現 *Tnnt2* alternative splicing form (exon 4 exclusion), 其長度為 166 bp。利用 RT-PCR 分析定量 wild type、STD 和 *z-mbnl1* morphants 的 *Tnnt2* splicing forms, morphants 的 *Tnnt2* unspliced form 在發育過程中無法順利的剪接成 *Tnnt2* alternative splicing form。將定量後 *Tnnt2* alternative splicing form 的量計算出其佔全部表現量的百分比, 此 alternative splicing form 的比例在 WT 胚胎到晚期 (48-96hpf) 有上升的趨勢; 而在 *zmbnl1* morphants 胚胎則一直維持在很低的比例, 在 96hpf 時分別只占 9.3% 與 15.2%, 相對於 WT 與 STD 其比例分別為 33.0 與 28.8%, 證明 *z-mbnl1* 的確具有調控其

alternative splicing的功能。

Clcn1 在DM病人骨骼肌中發現，其mbnl表現量異常而造成*clcn1*的蛋白質異構物發生錯誤剪接，導致其氯離子通道結構(subunit)的改變，使得病人出現肌強直的病徵。我們同樣的利用預測的斑馬魚*clcn1*序列合成primer，選殖出斑馬魚的三種*clcn1* RNA剪接型式，RT-PCR的結果顯示wild type在24hpf到96hpf只出現兩種isoform，經過定序後與人類*clcn1*的基因結構比對，發現其為包含exon1~6以及排除exon3的兩種*clcn1*剪接形式；而*z-mbnl1* morphants則會多表現一種同時排除exon2、3的異常剪接異構物。在96hpf時利用軟體定量分析，發現*z-mbnl1* morphants其exon2、3 excluding表現量的確比WT 與STD 較低。

Vinculin Vinculin是一種microfilament-associated細胞黏合蛋白質，可固定actin filament於細胞膜上。*Metavinculin*則是*vinculin*的一種剪接異構物。在老鼠中發現metavinculin多表現於骨骼肌與平滑肌中，並且與vinculin co-localizes以幫助vinculin黏合dense plaques與costameres，穩固肌纖維的構造。而脊椎動物*metavinculin*則與*vinculin*會同時表現於平滑肌與心肌之中，儘管其比例並不相同。我們利用預測的斑馬魚*vinculin*序列，選殖出*vinculin*及*metavinculin*，比對文獻中的基因結構圖，皆與老鼠相似並且含有多出204bp的*metavinculin*。觀察RT-PCR的表現情形，wild type 胚胎在48hpf與72hpf 其*metavinculin*皆與*vinculin*有相近的表現量。而*z-mbnl1* morphants 其*metavinculin* 的表現情形則低於*vinculin*。

Mbnl1 已知老鼠MBNL也會調控其本身splicing form，且分為embryonic form 與adult form。我們利用生物資訊的方法預測並比對斑馬魚與老鼠MBNL之序列，發現斑馬魚embryonic form為exon 5 included，adult form則為exon 5 excluded。因此將primer設計在exon 4與exon6之間，並以半定量PCR的方式比較96hpf wild type、STD 和*z-mbnl1* morphants 其mbnl1 splicing form的差異。96hpf時WT與STD胚胎mbnl1 C form表現量占mbnl1 A-D form 16.3%與 17.5%，且adult form表現量也占了42.6%與44.8%。相對於*zMbnl1* knockdown morphants其mbnl1 C form表現量明顯較低，只佔了8.6%與10.4%，同樣的在adult form表現量也降低至29.1%與26.2%。

異常表型的回復

為了探討注射 *z-mbnl* MO 所造成的胚胎異常表型是否有專一性且可以被回復，我們構築了 pCS2⁺-*z-mbnl1* 表達載，並製作出其 capped RNA。將此兩種 RNA 與其相對的 MO 一起注射至胚胎，觀察其表型回復的情形如下：

下顎軟骨的回復情形 在顯微注射後的第五天收集 WT、*z-mbnl* morphants 以及同時注射 *z-mbnl* MO 和 cRNA 的胚胎後利用 Alcain Blue 染色，並將其型態分為 normal、type 1 以及 type 2，再以統計其下顎軟骨回復的情形。*z-mbnl1* morphants 在下顎軟骨發育的異常表型明顯較為嚴重，我們將其型態分為：七對 pharyngeal arches 皆完整並且其結構相似於 WT 的 normal；部分軟骨結構還在，但卻未見七對 pharyngeal arches 的構型則分類為 Type 1；Type 2 則為更為嚴重的 morphants，整個下顎軟骨幾乎不見。在給予 520 pg/embryo cRNA 之前，單獨注射 4 ng/embryo *z-mbnl1* MO 其型態趨向於 Type 2(佔

87.8%)，而同時注射 *z-mbnl1* MO 及 cRNA 的胚胎其 Type 2 則降至 52.5%。且在第五天的存活率(38.6%)也高於給予 cRNA 回復前的胚胎(28.9%)。

心臟 jogging 回復 利用 *cmlc2* 在 48hpf 時專一性表現於心臟之特性，以 whole mount *in situ* hybridization 觀察其 jog 的方向性是否有回復。我們分別製備 *zmbnl1* A-D form 並分別與 *zMbnl1 morpholino1* 一起注射製胚胎中，結果發現其 defect rate 與單獨注射 *zmbnl1* MO1 相較皆有明顯下降趨勢。但除了 *zmbnl1* D form 其 normal type 只有 30%，其他 isoforms 皆有相當高的回復情形，從 35.7% 分別提高至 60%、54.5% 與 66.7%(圖十二)。

***zmbnl3* 過量表達後造成胚胎體節不正常排列**

除了 knock down 實驗以外，我們也以顯微注射 *zmbnl3* cRNA 從 gain of function 的角度來探討 *zmbnl3* 的功能。在 48hpf 有存活的胚胎裡，可發現注射 *zmbnl3* 之 cRNA 的劑量增加，體軸彎曲/縮短程度及畸形率也隨著提高，嚴重的胚胎存活無法超過 7 天。我們用 *myogenin* 做為探針，對過量表達 *zmbnl3* 的胚胎進行全胚體原位雜交實驗，觀察 19.5 hpf 時 *myogenin* RNA transcripts 於體節之表現(圖十三)。由實驗結果顯示，過量表達 *zmbnl3* 之胚胎其體軸嚴重縮短、兩側體節分開且不對稱彎曲、體節排列紊亂。利用 *myoD* 做為 probe 進行全胚體原位雜交觀察較早時期(12 hpf) *myoD* RNA transcripts 於體節之表現，顯示過量表達 *zmbnl3* 之胚胎其 *myoD* RNA transcripts 在軸側中胚層(paraxial mesoderm)表現量似乎有下降且不對稱表現(type 1)，更嚴重的胚胎(type 2)其軸側中胚層無法形成一直線，兩側分開且彎曲，其體節也有向側邊擴展的情形。由以上結果得知，過量表達 *zmbnl3* 會造成早期胚胎體節發育的異常。

***zmbnl3* 抑制 C2C12 細胞分化**

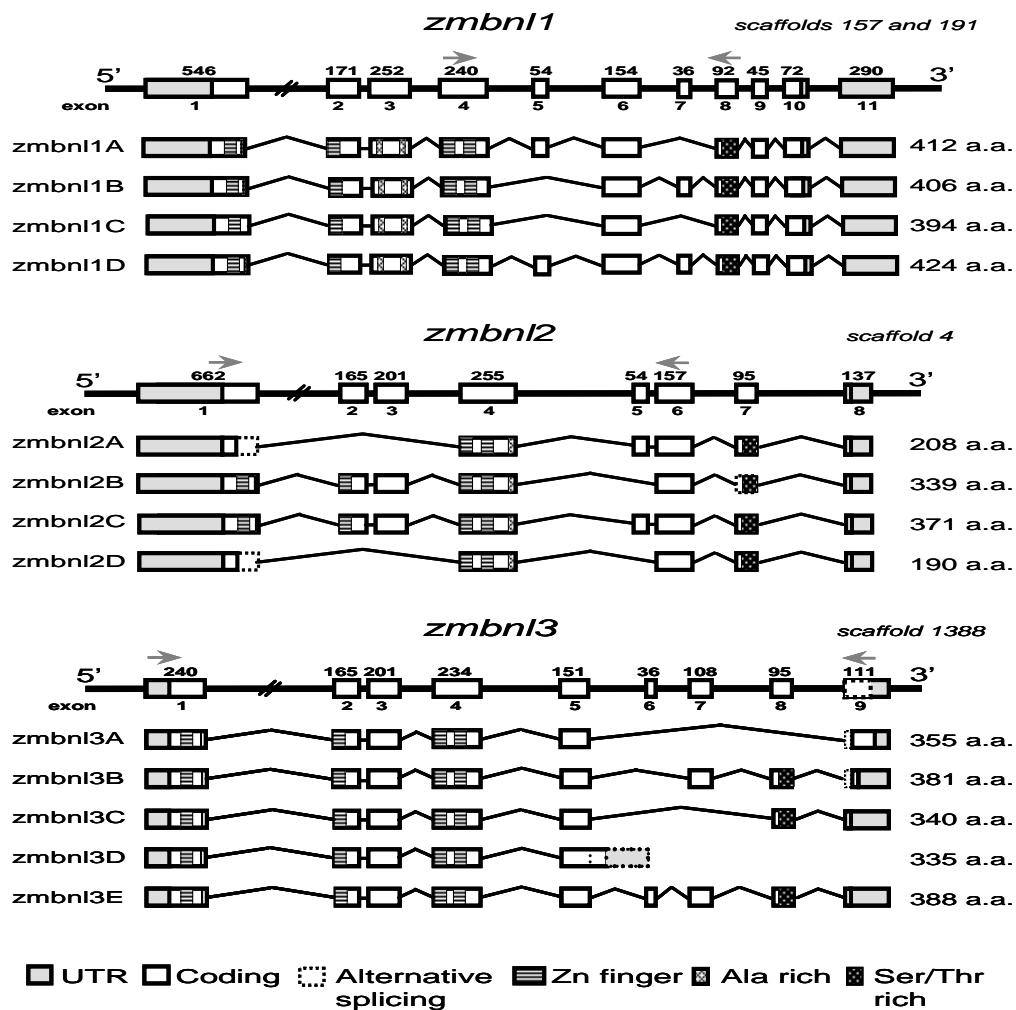
為探討 *zmbnl3* 是否會抑制肌肉細胞的分化，我們構築了 pEGFP-N3-*zmbnl3B* 質體，以 G41 篩選出持續表現質體的轉染細胞株。我們挑選了 3 個 enriched 細胞，將 growth medium 置換成 differentiation medium 培養 5 天後，在倒立螢光顯微鏡下觀察細胞分化型態。C2C12 細胞分化時，細胞彼此之間會相互融合形成長管形的多核細胞，即分化形成多核肌纖維(myotube)的構造。在分化 5 天後，發現表達 pEGFP-N3-*zmbnl3B* 之 C2C12 細胞其分化明顯被抑制(圖十四)。利用 *myoD*、*myogenin*、*mef2a*、*dystrophin*、myosin heavy chain(MHC)進行 RT-PCR 及西方點墨法分析，由實驗結果(圖十五)顯示，*myoD*、*dystrophin* 表現量並無明顯改變；而有表現 pEGFP-N3-*zmbnl3B* 之 C2C12 細胞其 *myogenin* 和 MHC 的表現量與 WT 相比，皆有明顯下降，且 *mef2a* 基因的 splicing patterns 較偏向分化前的形式。此結果顯示過量表現 *zmbnl3* 的確會抑制 C2C12 細胞發育。

***zmbnl3* 間接抑制 *myoD* promoter 的活性**

從上述實驗得知 *zmbnl3* 會影響斑馬魚胚胎肌肉發育，在細胞層次則會抑制 C2C12 細胞分化。先前文獻指出，hMBNL3 抑制 C2C12 細胞分化是透過抑制 myogenic

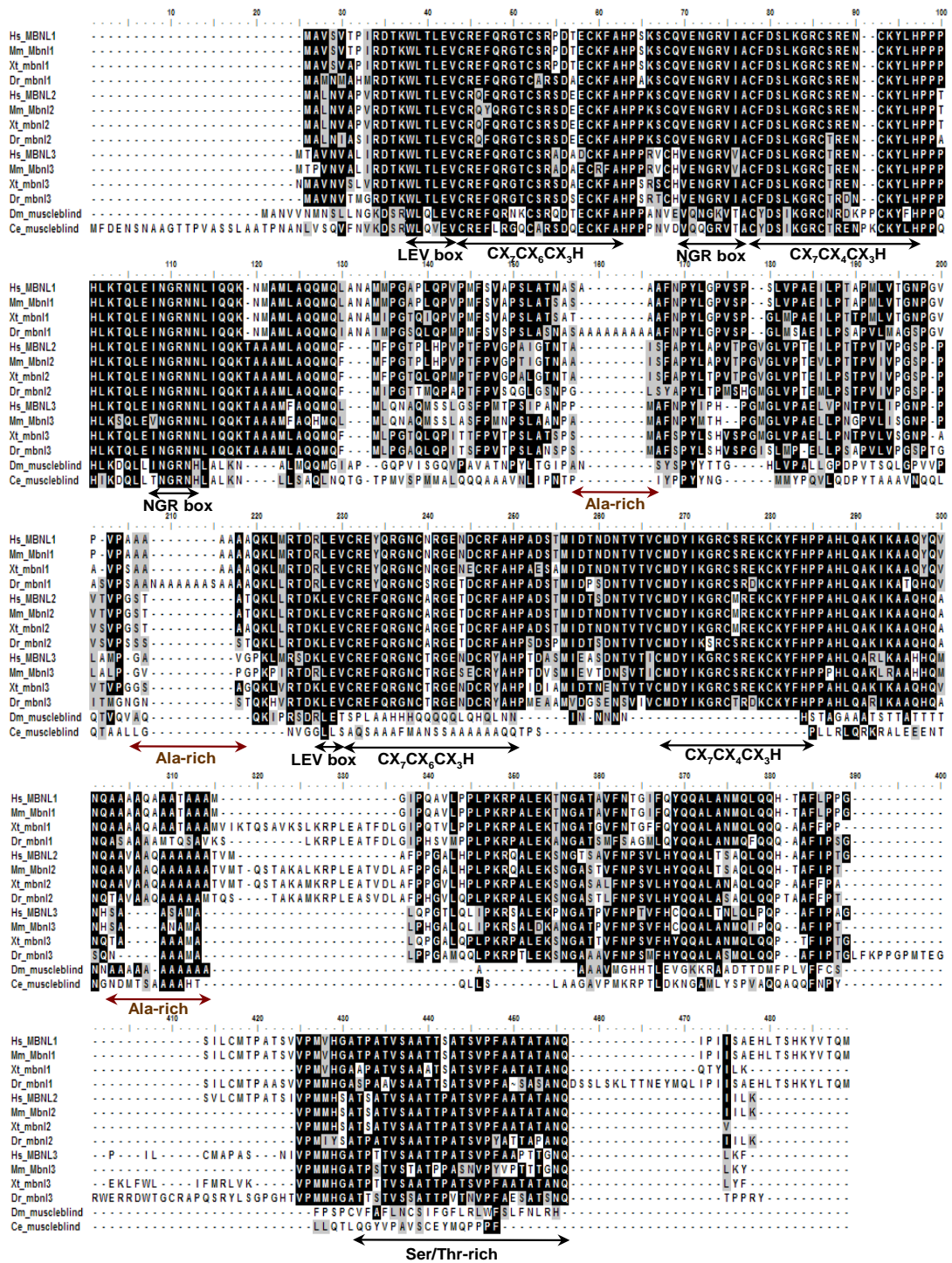
factor promoter 的 E-box，因此我們想進一步了解 *zmbnl3* 與 *myoD* 之間是否有調控關係。利用 Dual-Luciferase reporter assay，我們將 pGL3-*zmyoD* promoter (-1517/+201) 質體、pRL 質體和 pCS2⁺/*zmbnl3B/zmbnl3C* 質體混合後，注射至斑馬魚一個細胞時期之胚胎內，待 24hpf 後，進行 dual-luciferase 活性測定。結果顯示，表現 *zmbnl3B/3C* 的胚胎其 luciferase 活性顯著下降 70~80%(圖十六)。由此結果可以推論，*zmbnl3* 具有抑制 *myoD* promoter 的能力。然而將 *zmbnl3* 和 GAL4 DNA binding domain 融合後以 yeast one hybrid 方式測試，在含有 UAS-promoter-his reporter 的菌株中無法啟動 his 活性，顯示其不具有 transactivation 活性(圖十七)，推測其對 *myoD* promoter 的調控應為間接。

四、圖



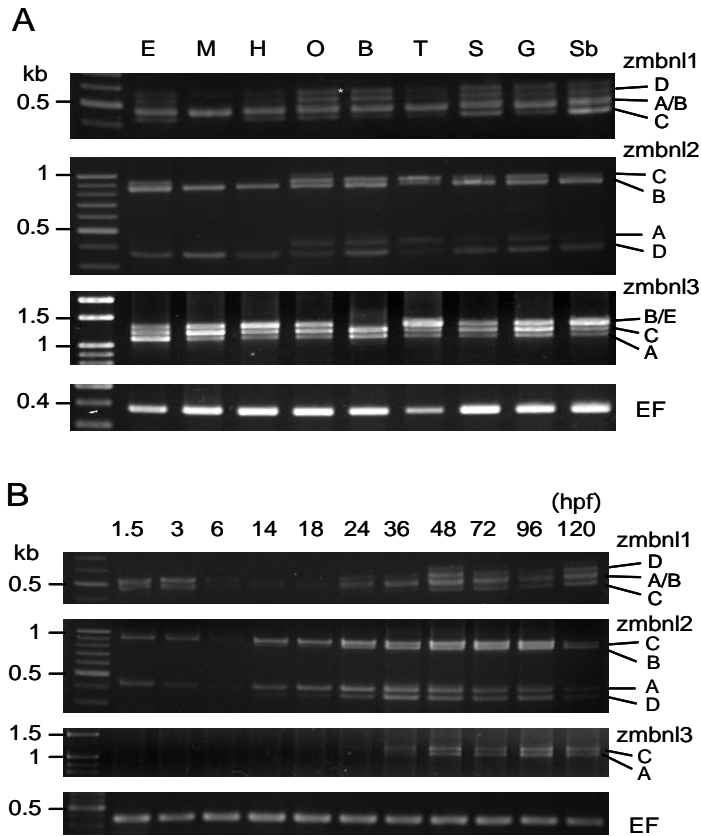
圖一、*z-mbnl1*、*z-mbnl2* 和 *z-mbnl3* 的基因結構

z-mbnl1 位於 Ch2，分別有 *z-mbnl1A*、*z-mbnl1B*、*z-mbnl1C* 和 *z-mbnl1D* 四種特異性剪接；*z-mbnl2* 位於 Chr1，同樣有四種 isoforms 分別為 *z-mbnl2A*、*z-mbnl2B*、*z-mbnl2C* 和 *z-mbnl2D*；*z-mbnl3* 則位於 Chr14，其 alternative splicing form 為 *z-mbnl3A*、*z-mbnl3B*、*z-mbnl3C*、*z-mbnl3D* 以及 *z-mbnl3E*。

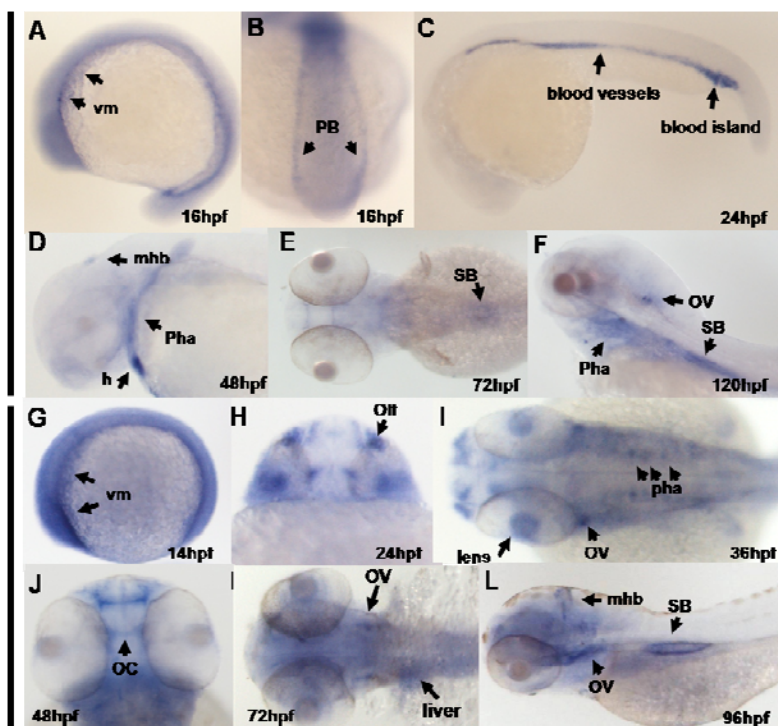


圖二、斑馬魚與其他物種的 mbnl 蛋白質之胺基酸序列比對圖

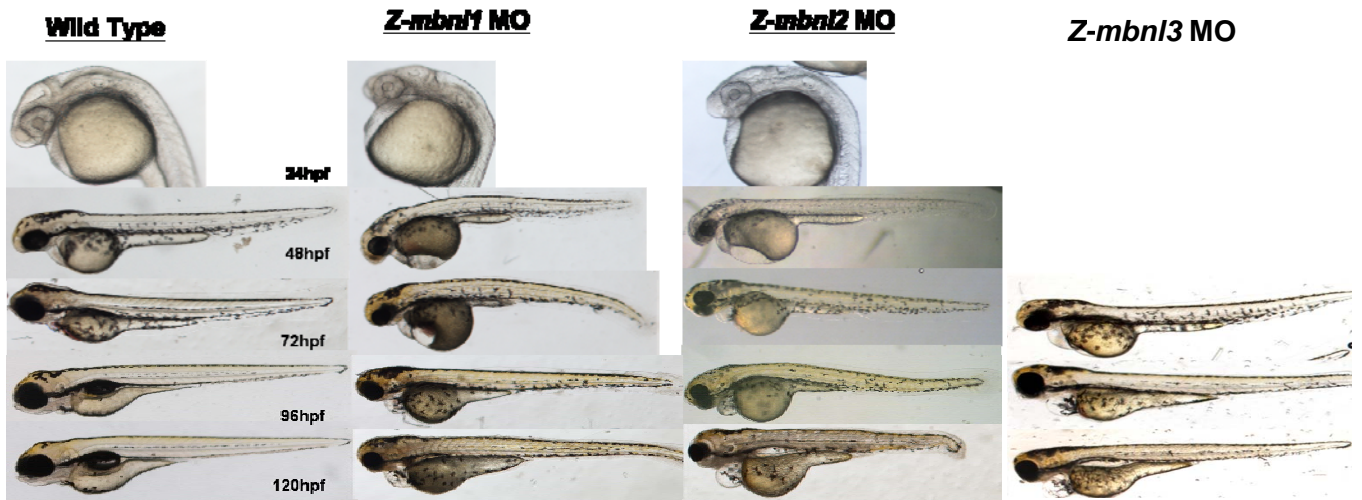
z-mbnl 在特殊序列或功能區上皆與其他脊椎動物相同，包括 Zine finger domain(CX₇CX₆CX₃, CX₇CX₄CX₃)； LEV box (WLVXLEV)、NGR box (V/IX0-2NGRV/NXA/L)；Ala- rich region；Ser/Thr-rich region 皆有高度保留。相同的胺基酸序列是黑色；相似的胺基酸為灰色。Hs, *Homo sapiens*； Mm, *Mus musculus*； Xt, *Xenopus tropicalis*； Dr, *Danio rerio*； Dm, *Drosophila melanogaster*； Ce, *Caenorhabditis elegans*.



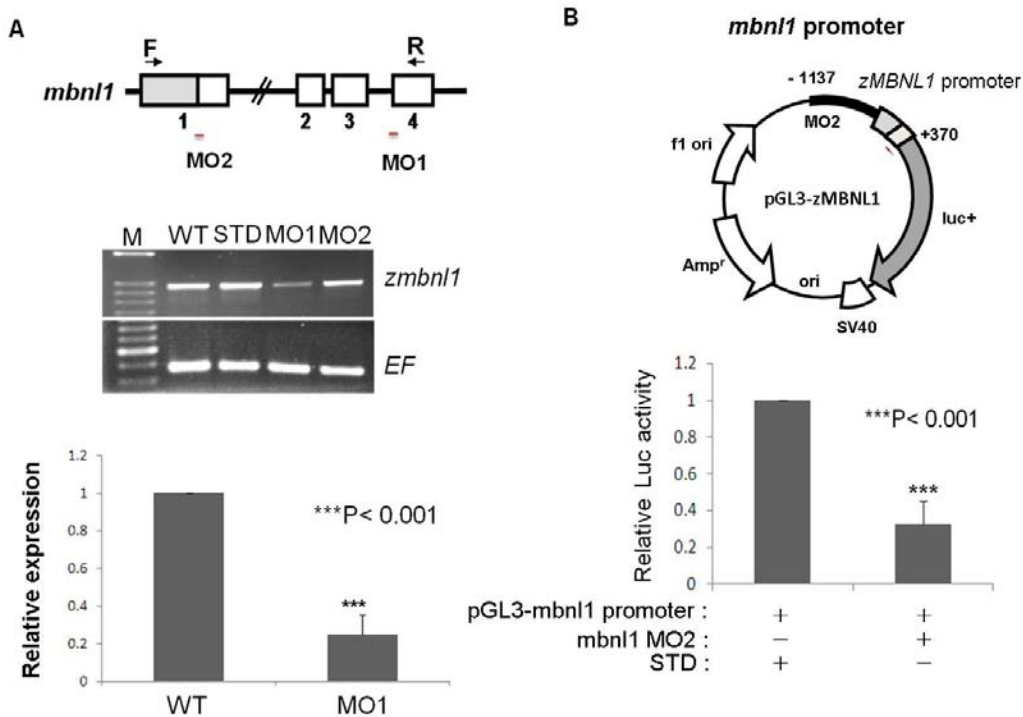
圖三、*z-mbnl1* 和 *z-mbnl2* 的基因表現。(A) 利用 RT-PCR 分析 *z-mbnl1* 和 *z-mbnl2* 在成魚不同組織中的表現。(B) 為 *z-mbnl1* 和 *z-mbnl2* 在不同胚胎時期的表現 (從 1.5 hpf 到 120 hpf.)。E, eye; M, muscle; H, heart; O, ovary; B, brain; T, testies; S, skin; G, gill; SB, swim bladder; hpf, hour post fertilization. 以 Elongation factor (Ef) 作為 internal control。



圖四、利用全胚體原位雜交技術觀察 *z-mbnl1* 及 *z-mbnl2* 在胚胎發育時其時間與空間的表現。*z-mbnl1* pattern (A~F) 和 *z-mbnl2* pattern (G~L) 在 14hpf~120hpf 於內胚層、腦部、耳囊、心臟、下顎、魚鰾與肝臟皆有表現。

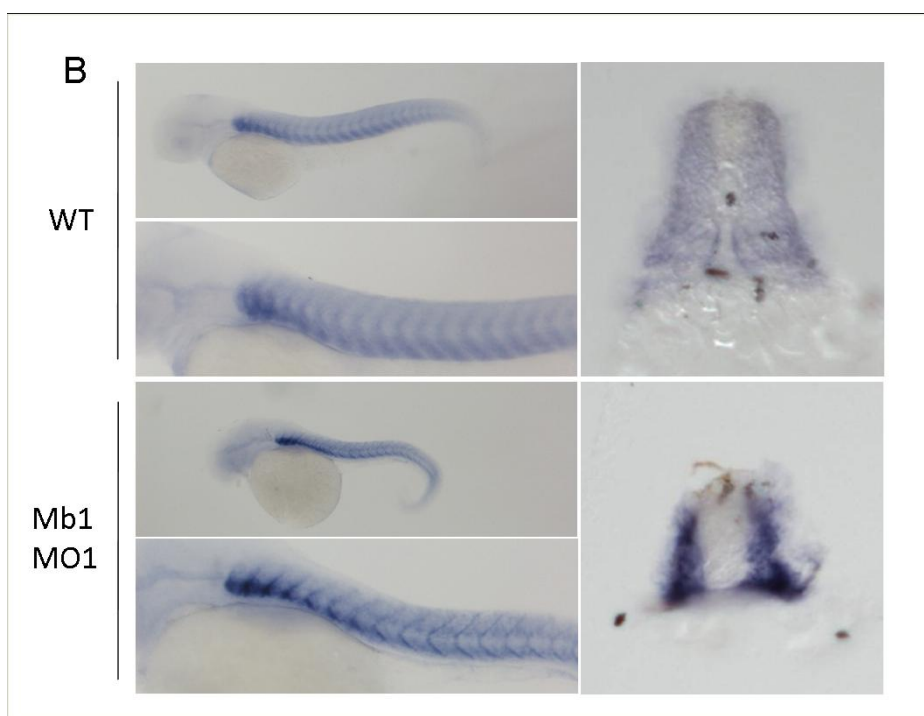
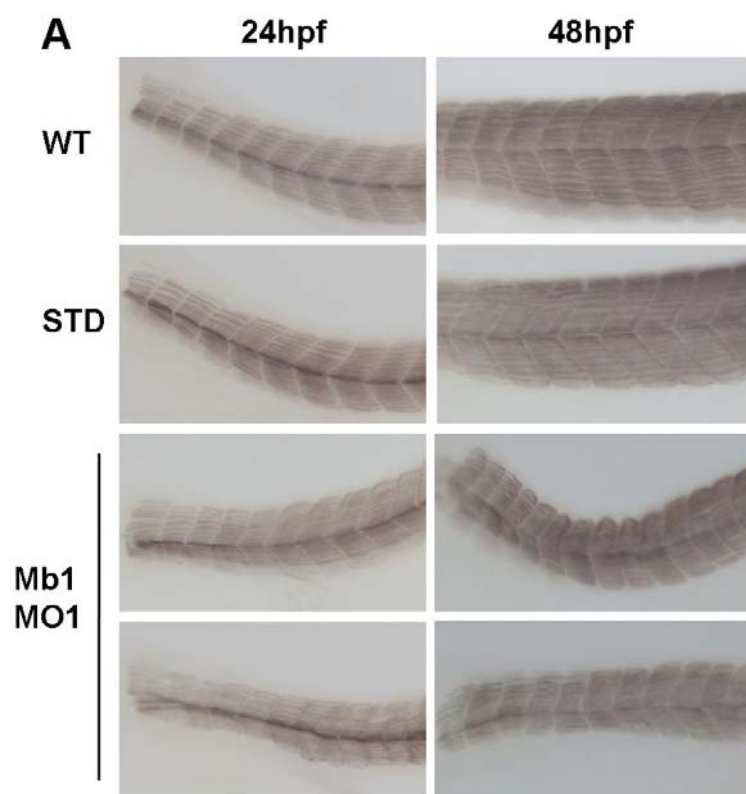


圖五、*z-mbnl* morphants 於 24hpf 至 120hpf 時期的表型。 *z-mbnl1* 和 *z-mbnl2* morphants 的異常表行皆包括腦部及眼睛的缺陷、心臟跳動及血流緩慢還有下顎發育缺陷。此外，*z-mbnl1* morphants 還有 circular swimming 的情形及較小的 yolk stem，*z-mbnl2* morphants 則在 120 hpf 之後有嚴重的腹部水腫。Z-mbnl3 morphants 則表型較輕微。



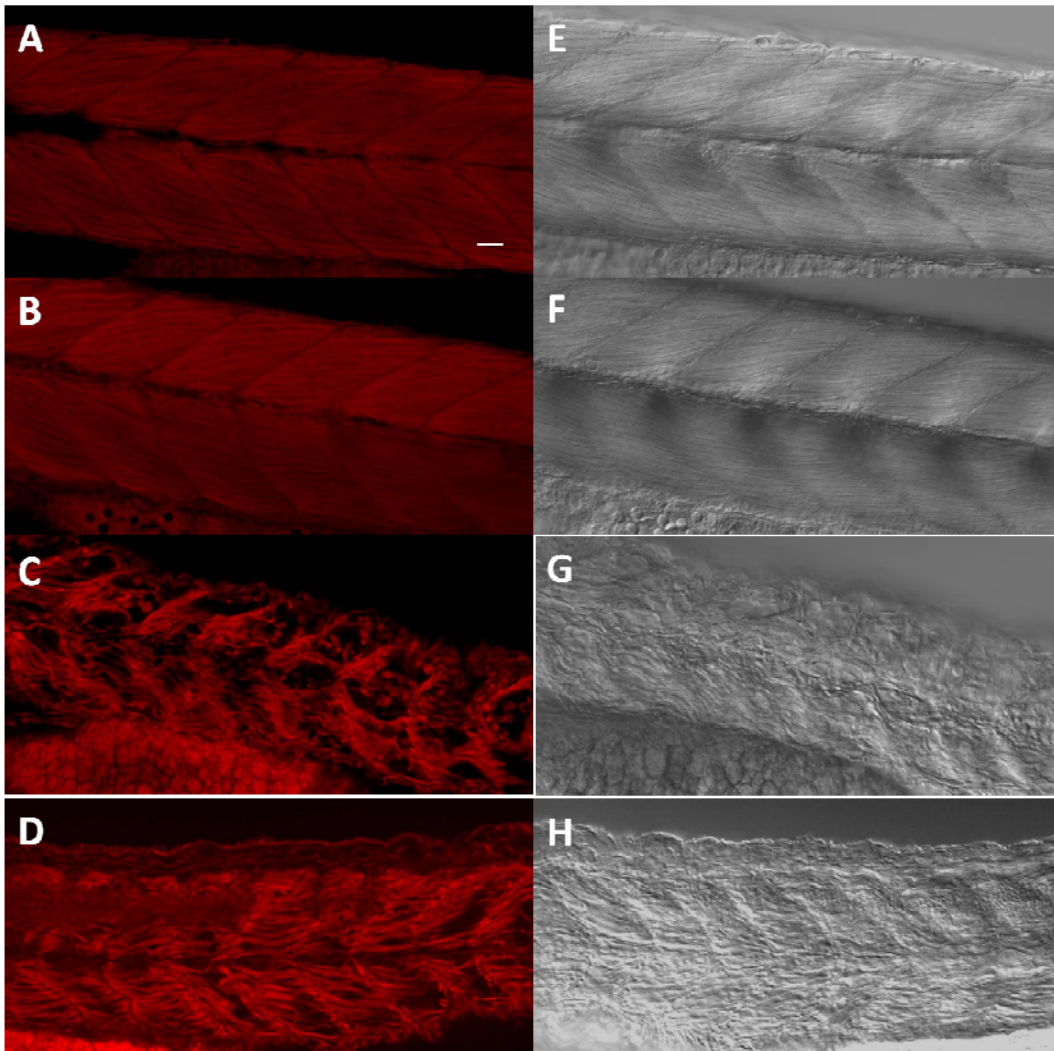
圖六、MO 的效力。 Use of MO1 to prevent correct splicing of *zMBNL1*. Inhibition of translation by MO2. The MO2 is targeted to sequence 5' of the translation start site and inhibits progression of the initiation complex. (A) Arrows indicate the positions of the forward (F) and reverse (R) PCR primers used to test the efficacy of the splicing MOs. Note that the predicted band in *z-mbnl1* MO1 is absent, probably because the PCR conditions do

not efficiently amplify products.(B) Transient expression assays were performed with pGL3-luc plasmids containing the internal *zmbnl1* promoter (-1137 to +370) after injection of the *zmbnl1* morpholino 2 or STD. The relative luciferase activity in the absence of *zmbnl1* morpholino 2(mo2) was set at 100%. Inducing levels show a significant reduction in the presence of coinjection pGL3-zMBNL1 promoter(-1137-+370), ***, $P < 0.001$.

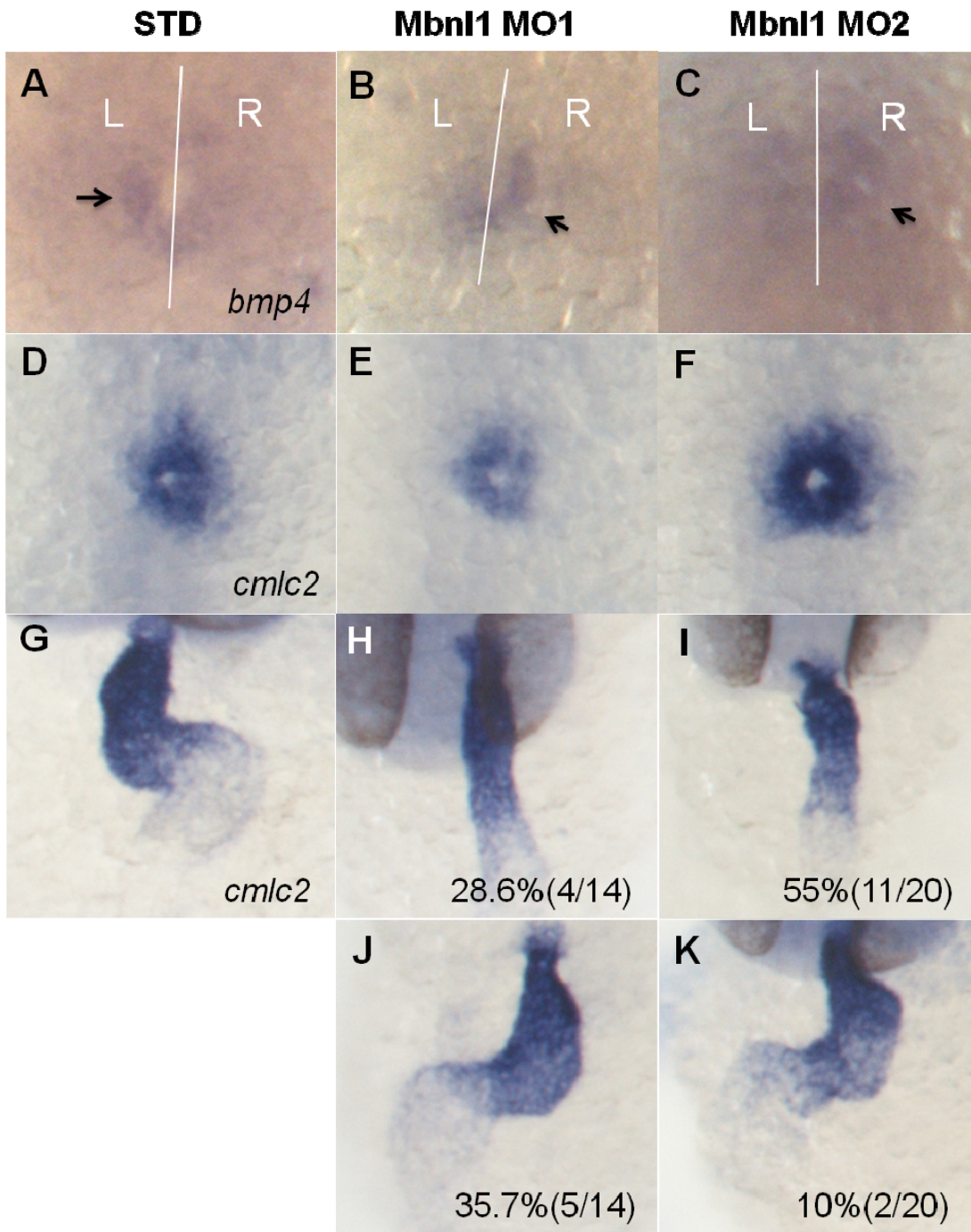


圖七、*mbnl1* knockdown 對慢肌和快肌的影響。(A)利用免疫組織染色以 anti-F-59 標

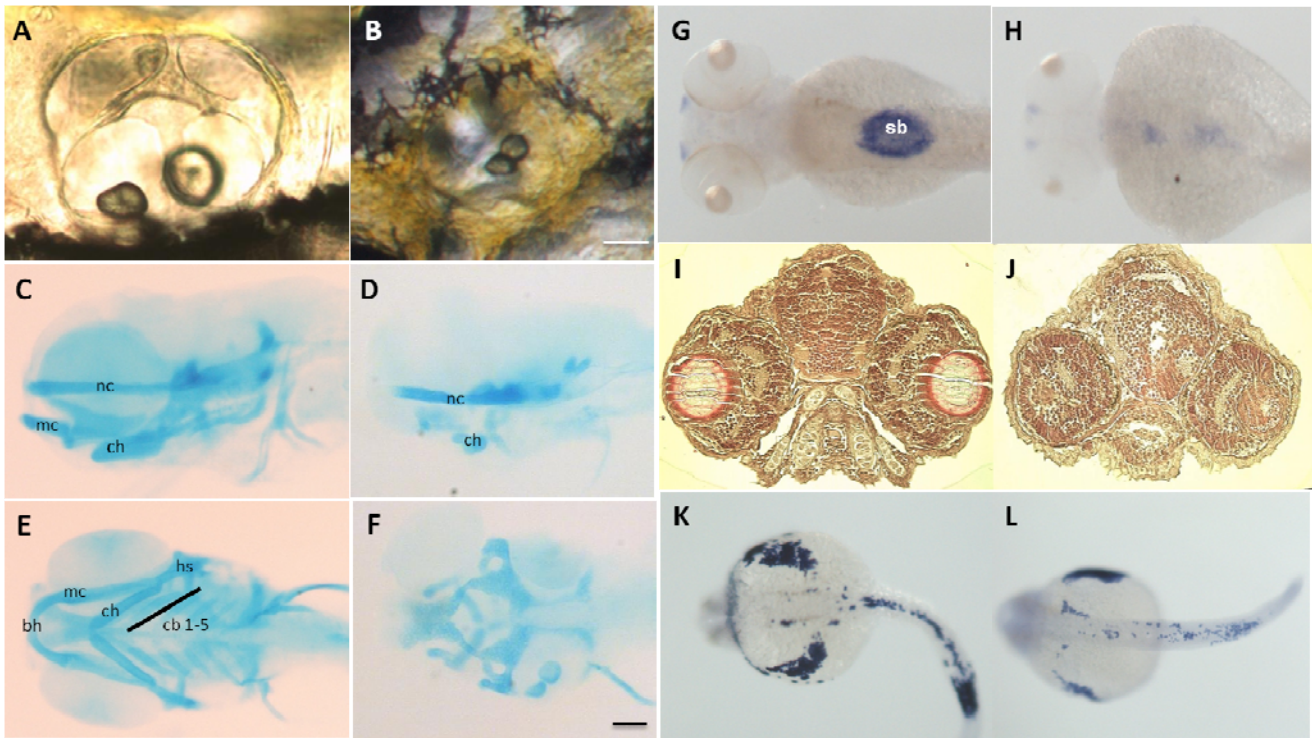
定 slow muscle，24hpf 時在正常胚胎慢肌排列平整覆蓋於 myotome 表層，而 *mbnl1* knockdown morphants 慢肌排列紊亂，myotome 較短且出現零星的空洞，在 48hpf 時更呈現波浪狀。(B) 以 *myhz2* probe 做原位雜交觀察 48hpf 的快肌型態。*mbnl1* knockdown morphants 其 *mylz2* 表現多半集中在 myotome 與 myotome 之間的界線。



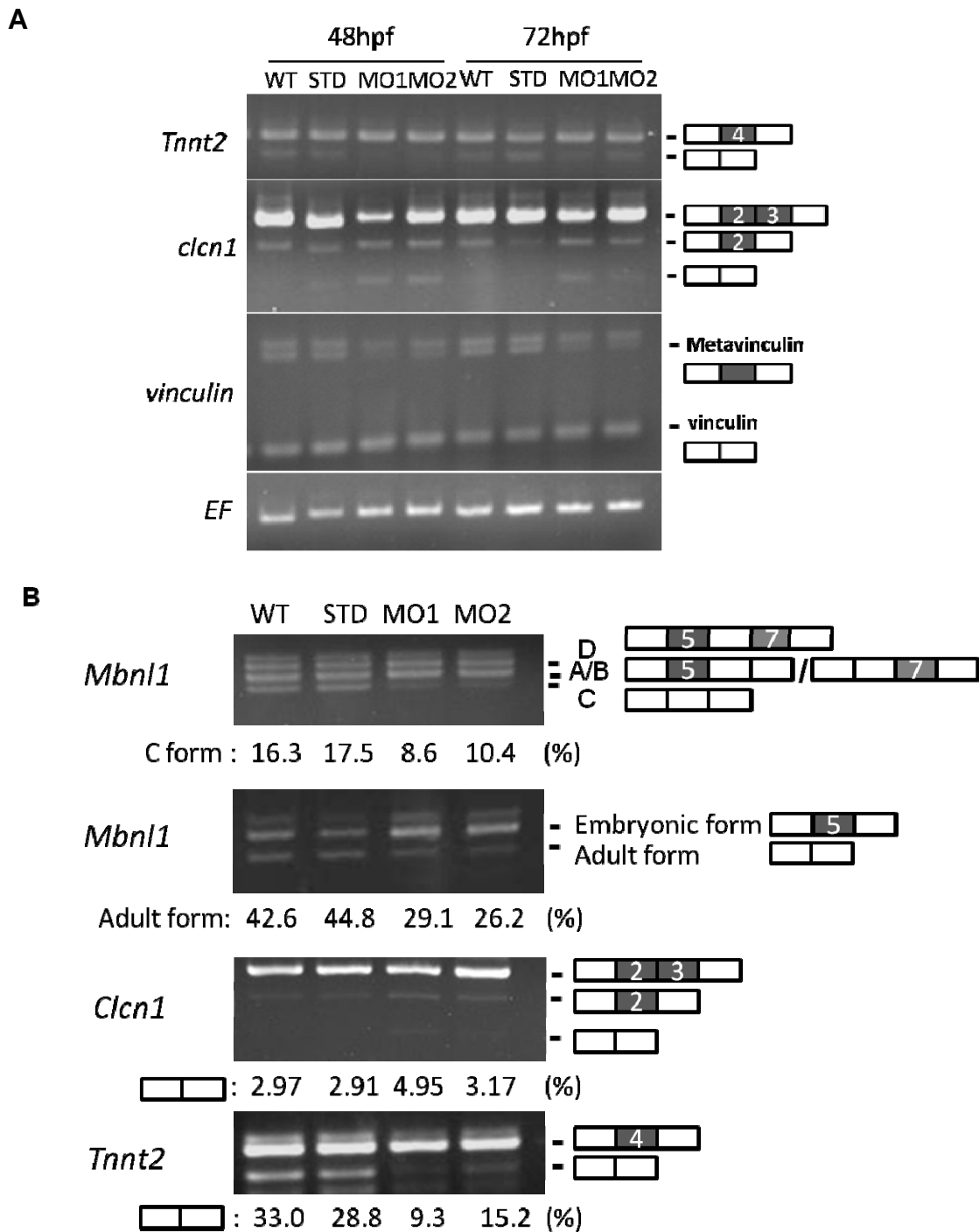
圖八、組織切片後利用 phalloidin 染色觀察肌肉細胞的型態。(A,E) WT，(B, F) STD control，(C, D,G, H) *mbnl1*-MO morphants。(A-D) phalloidin 染色 (E-H) DIC 明視野照片。



圖九、 In situ analysis of cardiogenesis in the *mbnl1* morphants. The expression of *bmp4* and *cmlc2* genes in WT and *mbnl1* knockdown embryos. (A-C) *bmp4* in cardiac primordium. The white line denotes midline (L, left; R, right). Normally, *bmp4* transcripts accumulate predominantly on the left side of the heart tube at the 22-somite stage (A). In *mbnl1* knockdown embryos the heart fails to jog (B, C). At the same stage, *cmlc2* expression in the heart is symmetric (D-F). Cardiac expression pattern of *cmlc2* in STD (G) and *mbnl1* MOs-injected embryos (H-K) at 48 hpf. In a WT embryo the heart tube exhibits normal cardiac looping (G), while some of the morphants exhibit absent (H, I) or reversed (J, K) cardiac looping. A-F, dorsal views; G-K, Frontal views; a, atrium; v, ventricle.

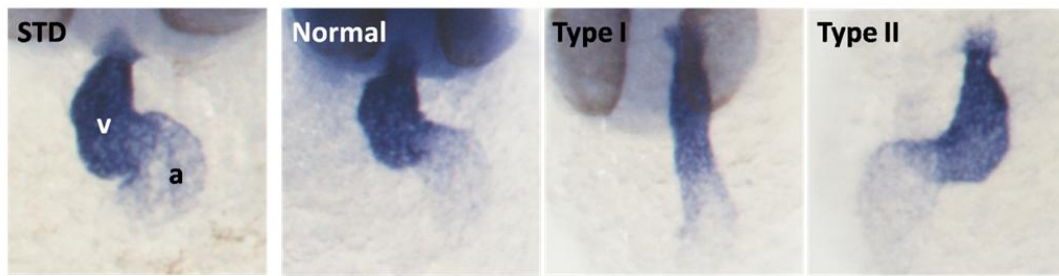


圖十 · *Mbnl1* knockdown larvae show defects in otoliths, arch cartilages, swim bladder, eyes and blood circulation. WT (A, C, E, G, I, K), and *mbnl1* knockdown (B, D, F, H, J, L) larvae at 5 dpf, 4dpf, or 24hpf. (A) The otic vesicle of a WT larva contains two otoliths, a smaller, anterior one lying in the horizontal plane and a larger, posterior one oriented vertically. (B) In *mbnl1* knockdown larvae, the otoliths are close or fused together. Alcian blue staining reveals the pattern of cartilage formation in the rostral region of a WT larva in normal (C, E) and morphants (D, F). Note the almost absence of pharyngeal cartilages in *mbnl1* morphants. (G) *anxa5* expression is seen in the swim bladder of WT larvae at 4dpf but not in *mbnl1* knockdown larvae (H). (I-J) H & E staining of the frontal sections of 5dpf larvae reveals defects in the eye differentiation. (K-L) *in situ* hybridization of *hbae1*(β e1-globin) expression. The expression is decreased in *mbnl1* morphants.



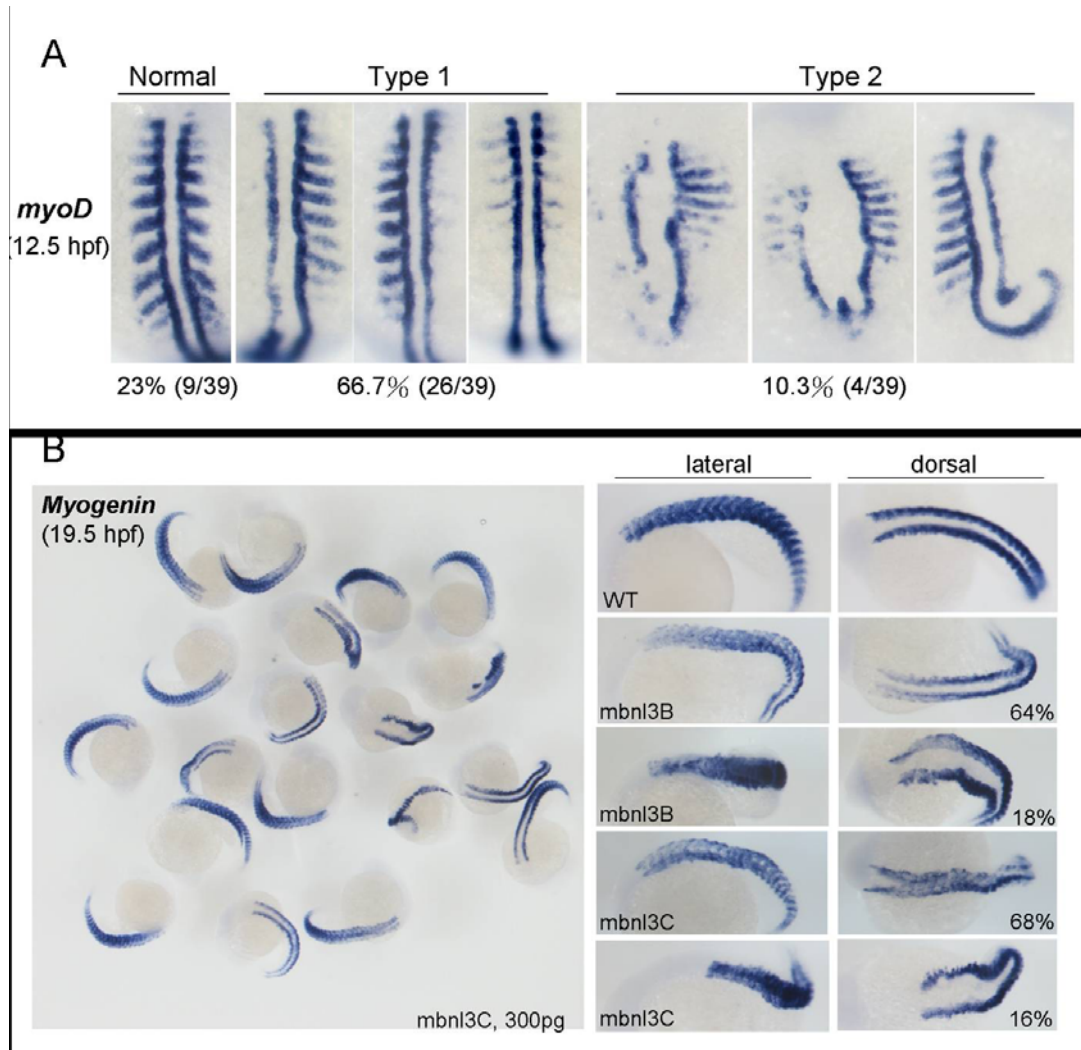
圖十一、Alternative splicing of *Tnnt2*, *Clcn1*, *vinculin*, *mbnl1* and *mef2ca* in *mbnl1* knockdown embryos. RT-PCR analysis of 48hpf -96hpf embryos. (A) *Tnnt2* exon 4 skipping is reduced in the *mbnl1* morphants compared to the wild type. Exclusion of *Clcn1* exon 2/ 3 was increased in *mbnl1* morphants. In wild type, metavinculin is spliced to an equal amount with vinculin but is reduced in *mbnl1* morphants. (B) Semi-quantitative RT-PCR analysis of total RNA isolated from 96hpf or 72 hpf (*mef2ca*) embryos. Representative RT-PCR gels for *mbnl1* A-D isoforms, *mbnl1* adult/embryonic forms, *Clcn1*, *Tnnt2* and *mef2ca* splicing forms are shown. The percents of the resulting splicing products of the indicated isoforms were quantified and shown below.

Mbnl1 MO1



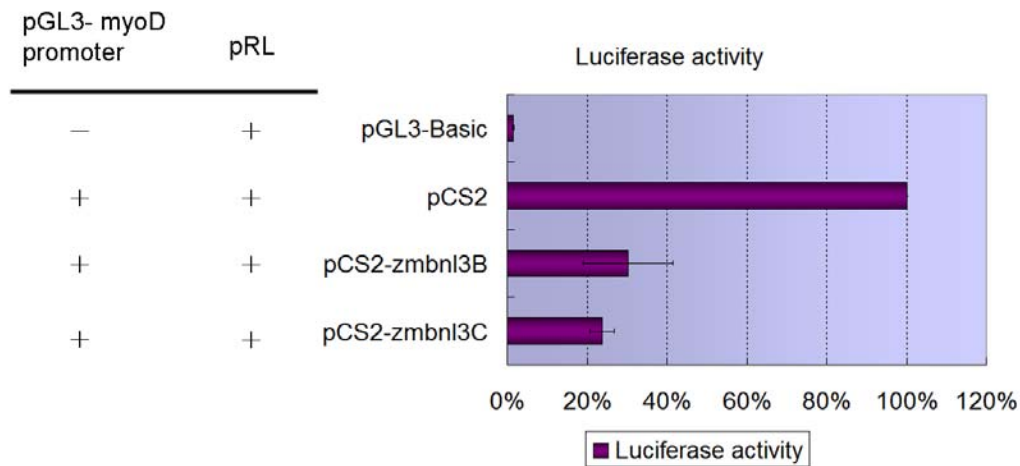
Dose	Defect rate (%)	Normal (%)	Type I (%)	Type II (%)
STD	0	100	0	0
Mbnl1 MO1 (4ng)	64.3 (9/14)	35.7 (5/14)	28.6 (4/14)	35.7 (5/14)
Mbnl1 MO (4ng) + z-mbnl1 A cRNA(400pg)	40.0 (6/15)	60.0 (9/15)	33.3 (5/15)	6.7 (1/15)
Mbnl1 MO (4ng) + z-mbnl1 B cRNA(400pg)	45.5 (5/11)	54.5 (6/11)	9.1 (1/11)	36.4 (4/11)
Mbnl1 MO (4ng) + z-mbnl1 C cRNA(400pg)	33.3 (3/9)	66.7 (6/9)	33.3 (3/9)	0
Mbnl1 MO (4ng) + z-mbnl1 D cRNA(400pg)	60.0 (6/10)	30.0 (3/10)	60.0 (6/10)	10.0 (1/10)

圖十二、In situ analysis of cardiogenesis in the *mbnl1* morphants. The expression of *cmhc2* genes in STD and *mbnl1* knockdown embryos at 48 hpf. In a STD embryo the heart tube exhibits normal cardiac looping, while some of the morphants exhibit absent (type I) or reversed (type II) cardiac looping. The normal pattern is restored by co-injection of *mbnl1* MO1 with *mbnl1* mRNA. a, atrium; v, ventricle.

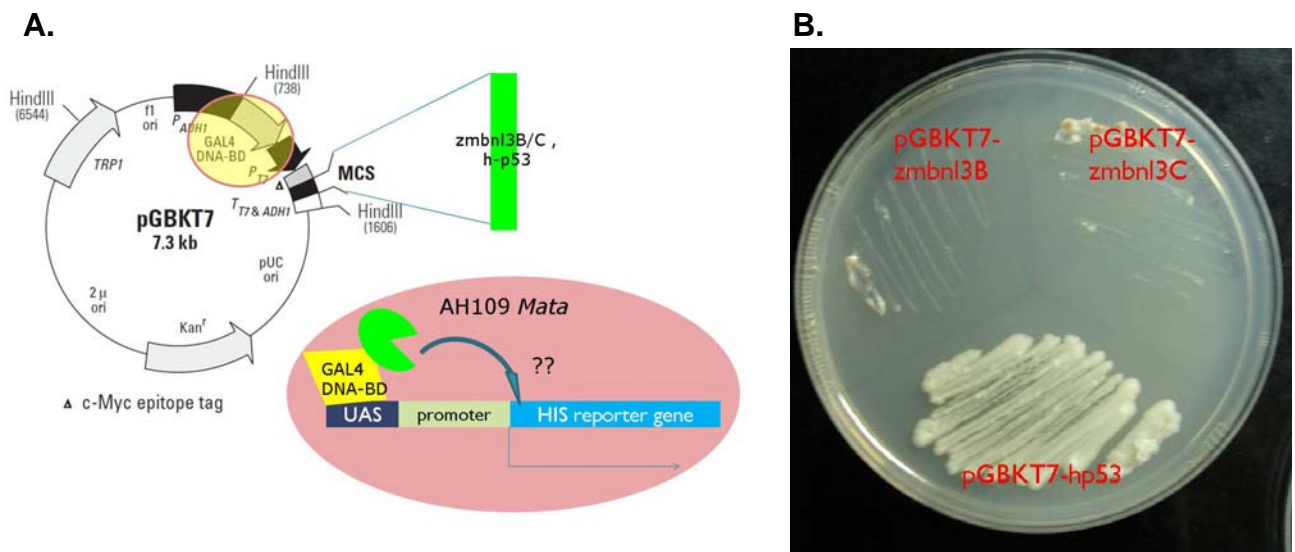


圖十三. 過量表達 *zmbnl3* 造成胚胎體節不正常排列。(A)利用 *myoD* 作為 marker 進行全胚體原位雜交實驗，在正常的胚胎 12 hpf *myoD* 會在 somites 整齊的排列，過量表達 *zmbnl3C* 造成 *myoD* 表現下降(type 1)及嚴重異常排列(type 2)。(B)利用 *myogenin* 作為 marker 進行全胚體原位雜交實驗，顯示過量表達 *zmbnl3C/B* 體節彎曲異常。

圖十五. 利用 RT-PCR 及西方點墨法分析 *zmbnl3B* 對於 C2C12 細胞分化指標基因表現的影響。利用 RT-PCR 分析 *myoD*、*myogenin*、*mef2a*、*dystrophin* 等基因表現看細胞分化的情形，*zmbnl3* 則是確定細胞帶有轉殖進入的 *zmbnl3B*-pEGFP-N3，GAPDH 作為 loading control。利用西方點墨法分析 MHC 蛋白質表現，actin 作為 loading control，每條 lane 所 load 的蛋白量為 50 μ g。 *zmbnl3B*-(pEGFP-N3)-1/2/3 分別代表 3 個不同的 lines。



圖十六. *zmbnl3* 能抑制 *myoD* promoter 的表現。共同顯微注射 pGL3-*myoD* promoter、pCS2⁺/pCS2⁺-*zmbnl3B*/pCS2⁺-*zmbnl3C* 和 pRL 到斑馬魚胚胎中，在注射後 24 小時測量 luciferase 活性。由實驗結果得到 pGL3-*myoD* promoter 的 luciferase 活性在同時注射 pCS2⁺-*zmbnl3B*/pCS2⁺-*zmbnl3C* 之後有下降的趨勢。



圖十七. *zmbnl3* 不具有 transactivation 活性。將 *zmbnl3* 和 GAL4 DNA binding domain 融合後以 yeast one hybrid 方式測試，在含有 UAS-promoter-his reporter 的菌株中無法啟動 his 活性，顯示其不具有 transactivation 活性。對照組以 human p53 序列測試。

計畫成果自評

本研究結果顯示，mbnl1 或 mbnl2 的缺失可以使斑馬魚胚胎出現與人類強直型肌肉萎縮症類似的病徵，因此可以作為此疾病的一個簡單動物模式，探討這些病徵與相關基因的調節及特異性剪接異常之關聯，進一步更可以以此模式進行小分子藥物的篩選，作為治療疾病的初步評估。除此之外，我們也觀察到病徵以外的表型，顯示 mbnl 可能參與更多的細胞發育程序，例如左右對稱的調控及血液細胞分化的調控，在之前的文獻不是沒有發表過就是著墨甚少，此部分可能可以延伸探討。在 mbnl3 的部份我們其對早期胚胎發育功能不明顯，以細胞模式發現 mbnl3 反而可以經由 MyoD-dependent 途徑來抑制肌肉細胞進行分化。更新的結果顯示 mbnl3 可能與細胞週期調控及細胞老化過程有關，這些都是全新的發現，進一步研究對於 mbnl 家族蛋白質在細胞內的生理功能將有更全面性的了解，不論在疾病機轉或基礎發育方面都提供很好的學術及應用價值。

參考文獻

1. Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17: 419-437.
2. Pascual M, Vicente M, Monferrer L, Artero R (2006) The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* 74: 65-80.
3. Ho TH, Charlet BN, Poulos MG, Singh G, Swanson MS, et al. (2004) Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J* 23: 3103-3112.
4. Worthington MT, Amann BT, Nathans D, Berg JM (1996) Metal binding properties and secondary structure of the zinc-binding domain of Nup475. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13754-13759.
5. Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ (2002) Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. *J Biol Chem* 277: 9606-9613.
6. Gaiano N, Amsterdam A, Kawakami K, Allende M, Becker T, et al. (1996) Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. *Nature* 383: 829-832.
7. Bai C, Tolia PP (1996) Cleavage of RNA hairpins mediated by a developmentally regulated CCCH zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 16: 6661-6667.
8. Wang LC, Hung WT, Pan H, Chen KY, Wu YC, et al. (2008) Growth-dependent effect of muscleblind knockdown on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 705-709.
9. DeMaria CT, Sun Y, Wagner BJ, Long L, Brewer GA (1997) Structural determination in AUF1 required for high affinity binding to A + U-rich elements. *Nucleic Acids Symp Ser*: 12-14.
10. Kay BK, Williamson MP, Sudol M (2000) The importance of being proline: the

- interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 14: 231-241.
11. Monferrer L, Artero R (2006) An interspecific functional complementation test in *Drosophila* for introductory genetics laboratory courses. *J Hered* 97: 67-73.
 12. Begemann G, Paricio N, Artero R, Kiss I, Perez-Alonso M, et al. (1997) muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124: 4321-4331.
 13. Artero R, Prokop A, Paricio N, Begemann G, Pueyo I, et al. (1998) The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol* 195: 131-143.
 14. Kanadia RN, Urbinati CR, Crusselle VJ, Luo D, Lee YJ, et al. (2003) Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* 3: 459-462.
 15. Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, et al. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302: 1978-1980.
 16. Shang CA, Thompson BJ, Teasdale R, Brown RJ, Waters MJ (2002) Genes induced by growth hormone in a model of adipogenic differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 189: 213-219.
 17. Adereth Y, Dammai V, Kose N, Li R, Hsu T (2005) RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1. *Nat Cell Biol* 7: 1240-1247.
 18. Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshere MG, et al. (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.
 19. Mankodi A, Urbinati CR, Yuan QP, Moxley RT, Sansone V, et al. (2001) Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* 10: 2165-2170.
 20. Miller JW, Urbinati CR, Teng-Ummuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, et al. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19: 4439-4448.
 21. Ranum LP, Day JW (2004) Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* 74: 793-804.
 22. Fardaei M, Larkin K, Brook JD, Hamshere MG (2001) In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* 29: 2766-2771.
 23. Hsiao CD, Tsai WY, Horng LS, Tsai HJ (2003) Molecular structure and developmental expression of three muscle-type troponin T genes in zebrafish. *Dev Dyn* 227: 266-279.
 24. Buj-Bello A, Furling D, Tronchere H, Laporte J, Lerouge T, et al. (2002)

Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum Mol Genet* 11: 2297-2307.

25. Witt S, Zieseniss A, Fock U, Jockusch BM, Illenberger S (2004) Comparative biochemical analysis suggests that vinculin and metavinculin cooperate in muscular adhesion sites. *J Biol Chem* 279: 31533-31543.
26. Charlet BN, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, et al. (2002) Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10: 45-53.

國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：98年7月30日

計畫編號	NSC 97-2320-B-040-013-MY3		
計畫名稱	Muscleblind 家族蛋白質的功能研究		
出國人員 姓名	潘惠錦	服務機構 及職稱	中山醫學大學生物醫學系教授
會議時間	2009年7月15日 至 2009年7月19日	會議地點	義大利羅馬
會議名稱	(中文)第六屆歐洲斑馬魚遺傳及發育會議 (英文) 6 th European Zebrafish Genetics and Development Meeting		
發表論文 題目	(中文) 1. Muscleblind 蛋白質在早期斑馬魚發育之功能研究 2. 新穎同原箱基因 Irx11 參與斑馬魚的腦部、肌肉及咽喉鰓弓之發育 (英文) 1. Functional studies of muscleblind proteins in early zebrafish development 2. Irx11 is a novel homeobox gene involved in brain, muscle and pharyngeal arch development in zebrafish		

一、參加會議經過

斑馬魚的國際會議照慣例偶數年在美國舉行，奇數年在歐洲舉行。2004年我參加了在Madison舉行的會議之後，很希望有機會可以參加歐洲舉行的會議。今年歐洲的會議是第6屆，在義大利的羅馬舉行。由於時機和地點都合適，就督促學生儘快完成實驗可以去會議發表。今年我報名了兩篇poster，其中一篇在出發前已經投稿到developmental dynamics，因此在開會時發表data較無負擔。(後記，此篇論文7月底開完會後接到editor建議revise，經過修改後於11月被接受刊登。)

會議第一天有4個workshop，前3個是給事先註冊的人參加討論zebrafish genome resource，我於下午報到後參加另一個由ZIRC, ZHA UCL舉辦的husbandry workshop，學到一些基本的魚房照顧經驗和知識。晚上的keynote lecture由 Dr. Stefano Piccolo主講TGF signaling in development and cancer，之後參加welcome reception。由於會場很大，顯得很空曠，感覺參加人數不多，可能因為部分與會者尚未報到之故。第二天的會議分為四個 sessions (I-IV)，分別為 I - Early

development, gastrulation and segmentatio, II - Signaling, III - Gene regulation以及IV - Organogenesis。第三天及第四天的會議各有三個sessions (V-VII和VIII-X)，期間下午14:30到16:00為poster presentation。第二場keynote lecture在第三天晚上由 Dr.Nadia Rosenthal主講 Enhancing mammalian regeneration。Session V: Emerging technologies, Session VI: Genomic workshop, Session VII: Cancer, Session VIII: Disease models, Session IX: Cardiovascular system, Session X: Hematopoiesis and immunessystem。最後一天早上有二個session(Session XI- Neurobiology I: patterning and behavior, Session XII-Neurobiology II: sensory organs and regeneration)。議程安排緊湊，但因為都是plenary session，所以也不至於有需要趕場的忙亂，除了正式的poster presentation時段之外，因poster一直展示在會場，任何時間都可以參觀瀏覽，在coffee break時大家一邊吃點心一邊看poster，氣氛悠閒輕鬆，算是不錯的安排。

我的兩篇poster (P78, P79)分別在第二天和第三天present，參觀的人非常多，我因此也和他們有一些討論，包括53MO注射的劑量，phenotype的分析，是否為non-specific phenotype的認定等，有些人給了很好的建議。我注意到有兩位參觀者很認真的一邊看我的poster一邊做筆記，上前詢問得知他們的morphant也有類似的phenotype，因此想參考我們的實驗方法驗證。同時我也在參觀別人的poster中發現很多有趣的觀察，如muscle fiber的異常觀測法，swim bladder的異常，以及如何有系統的觀察胚胎或幼魚的表型及行為異常等，可能可以作為小分子毒性的探討，對於我目前在使用斑馬魚胚胎探討奈米毒性的研究有一些幫助。另外和從台灣來的黃詮珍、黃聲頻以及蕭崇德老師也有機會聊到實驗的進展。在旅館早餐時認識從美國University of Oregon ZIRC來的研究人員，彼此也聊得很愉快。

二、與會心得

本次會議參加人員來自歐美亞洲各地，研究主題探討包括發育、訊息傳導、基因調控、神經、癌症、心血管、新興技術等方面的課題。在五天會議當中，對於使用斑馬魚作為疾病研究模式，特別是在癌症及心血管系統等疾病的應用有很深的印象，因為在遺傳疾病、血液及免疫系統方面的報告很多，預期利用斑馬魚研究其他疾病的致病機轉也將成為新的趨勢。此外，隨著基因體及蛋白質體學研究技術的快速進展，全基因體及高通量篩選衍生的新興技術應用也愈來愈多，分子及基因標定技術(利用基因轉殖數個螢光基因)也愈來愈普遍。不僅在斑馬魚研究相關的培育及分子生物學技術等進展很快，在研究主題上也有新的方向。

三、考察參觀活動(無是項活動者略)

無

四、建議

無

五、攜回資料名稱及內容

6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting Program & Abstracts

六、其他

FUNCTIONAL STUDIES OF MUSCLEBLIND PROTEINS IN EARLY ZEBRAFISH DEVELOPMENT

Kuang-Ming Hsiao¹, Li-Chun Tu², Chieh-Wen Lin³ and Huichin Pan³

¹Department of Life Science, National Chung Cheng University, Chia-Yi, ²Institute of Medicine, ³Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

Muscleblind (MBNL) is a family of proteins that participate in the regulation of tissue-specific alternative splicing. They bind to RNA through a conserved CCCH zinc finger domain. Three paralogs (Mbnl1, 2, and 3) have been identified in mammalian, each promotes inclusion or exclusion of specific exons on different genes. Misregulation of MBNL activity in human leads to RNA-mediated pathogenesis. To investigate the functions of Mbnl proteins in early vertebrate development, we cloned the *muscleblind* genes in zebrafish (*zmbnl1*, 2 and 3). Alternative splicing of the three *zmbnl* primary transcripts gives rise to at least 13 protein isoforms. These genes are broadly expressed in most adult tissues. During embryogenesis, *zmbnl1* and *zmbnl2* are both maternally and zygotically expressed. In contrast, *zmbnl3* transcripts are not detected until late pharyngula stage. Whole-mount *in situ* hybridization reveals that *zmbnl1* is expressed in lens, liver, otic vesicle, and muscle, while *zmbnl2* is expressed in lens, olfactory epithelium, branchial arches, midbrain hindbrain boundary and swim bladder. Expression of *zmbnl 3* is more ubiquitous rather than specific. Knockdown of *zmbnl1* and *zmbnl2* results in malformation of the brain, eyes, otoliths, pharyngeal arches, heart and swim bladder. In addition, these morphants are defective in hatching and swimming behavior. In consistent with the phenotypes, the splicing patterns of several pre-mRNAs that are misregulated in cells with CUG RNA expansion, are altered in the morphant embryos. Knockdown of *zmbnl3* does not result in overt phenotype. On the contrary, microinjection of *zmbnl3* cRNA into the embryos resulted in defective embryos with crooked body axes and short somites. When introduced into C2C12 cells, *zmbnl3* is able to inhibit cell differentiation, as evidenced by lack of cell fusion, change of splicing pattern and reduction of MHC expression. Dual-luciferase assay further reveals that *zmbnl3* down-regulates myoD promoter activity in fish embryos. These data indicate that *zmbnl1* and *zmbnl2* are crucial for early fish development and that *zmbnl3* may interfere with muscle differentiation through the MyoD-dependent pathway.

Dear Huichin Pan,

I am writing on behalf of the Zebrafish 2009 Organizing Committee to inform you that your abstract

FUNCTIONAL STUDIES OF MUSCLEBLIND PROTEINS IN EARLY ZEBRAFISH
DEVELOPMENT

has been accepted as poster .

Poster should be 70 cm. width x 100 cm. height.

Your poster has to be put on display on the numbered panel 079 from July 15th, 1pm .

The poster should be removed on Sunday , July 19th, 2009 before 11.00. If posters are not removed within the time set for dismantling, your poster will be removed and destroyed by the Organizing Secretariat.

Assistance and material for mounting posters will be available from set-up time at the Secretariat Desk

Poster authors are requested to be present in the Poster area for poster presentation from 14:30 to 16:00 as follows:

- on July 17th 2009 Odd Numbers presentation

- on July 18th 2009 Even Numbers presentation.

Should you have any query, please do not hesitate to contact the Organizing Secretariat within Friday, June 12th 2009.

Thank you for your kind attention and cooperation.

Best regards

Chiara Angelucci

Organizing Secretariat

國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：100年7月20日

計畫編號	NSC 97-2320-B-040-013-MY3		
計畫名稱	Muscleblind 家族蛋白質的功能研究		
出國人員 姓名	潘惠錦	服務機構 及職稱	中山醫學大學生物醫學系教授
會議時間	2011年7月5日 至 2011年7月9日	會議地點	蘇格蘭愛丁堡
會議名稱	(中文)第七屆歐洲斑馬魚會議 (英文) 7 th European Zebrafish Meeting		
發表論文 題目	(中文) 1. 斑馬魚 muscleblind-3 之功能性分析 2. 斑馬魚 Irx11 負調節 myoD 之表現及肌肉分化 (英文) 1. Functional analysis of zebrafish muscleblind-like 3. 2. Zebrafish Irx11 negatively regulates myoD expression and muscle differentiation.		

一、參加會議經過

今年三月初系上楊建洲老師詢問暑假有無意願參加歐洲斑馬魚會議，由於地點在蘇格蘭愛丁堡頗具吸引力，且系上另一位李娟老師也有興趣，於是大家相約結伴同行。

我們7月4日出發，5日早上抵達愛丁堡，旅館 check in 之後就先在市區搭觀光巴士遊覽了一圈。下午養足精神，傍晚到會場報到並參加 reception。此時第一梯次的 poster 已陸續有人貼上，方便大家先做瀏覽。在這邊遇到許多台灣來的老師和學生，聽說亞太地區包括中國日本新加坡以及台灣均有多人出席，歐美人數更多，會場顯得非常擁擠。

第二天早上由「Technology」plenary session 揭開序幕，緊接著是「Neurogenesis/Gliogenesis」session，下午1點到3點是 poster 時間，接下來還有兩場 parallel symposium 到5點，然後是5點半到6點半的 keynote lecture，晚上再有 poster 時間到8點，一整天下來行程非常緊湊充實。第三天的行程安排類似，第四天早上則是先有4場 parallel symposium，下午 poster 和 plenary session，最後一天早上由「Disease model」plenary session 和 keynote lecture 壓軸，共計有2場 keynote

lecture, 6 場 plenary section 及 10 場 parallel symposium。本次會議涵蓋眾多主題，除上述提到的之外，另有較傳統的 early patterning/ organogenesis/ muscle, skin, connective tissue/ neural crest/ axon guidance and circuit formation/ sensory systems/ cardiovascular and hematopoiesis/ cancer 及較新的 behavior / screens/ high throughput analysis/ comparative developmental biology/ stem cells /infection and immunity 等領域。另外，兩個梯次的 poster viewing，每梯次各有兩百多篇的壁報展出。

我的壁報展示時間是第一梯次，即 7/6 的 13:00 -15:00 和 18:30-20:00。今年我有兩篇壁報，一為 muscleblind, 另一為 Irx11 相關，兩篇都與 muscle 發育有關，因此被放在 muscle, skin, connective tissue 的主題。此次會議的展示廳雖涵蓋一樓及地下室兩個大廳，但因有部分空間提供給廠商展示商品，加上論文數目多，所以顯的相當擁擠。我的壁報是 P1-75, P1-76 相鄰的兩個位置，位在地下室的靠牆邊緣角落，出入不便，所以繞進來參觀的人不是很多。不過還是有幾位學生、博士後研究員駐足瀏覽，我也幫他們說明實驗過程並有一些討論。有一、兩位對我們使用 yeast one hybrid 的技術篩選轉錄因子結合序列感到相當有趣，我也提供他們論文進一步參考。趁有空檔時我也參觀了別人的壁報，除了主題多樣內容豐富之外，對於壁報製作之格式編排我也學到了許多。

此次會議因在愛丁堡這個充滿歷史古蹟的文化古城舉辦，主辦單位也別出心裁的安排了一場晚宴在愛丁堡地標的古堡中舉行，我們因而有機會參觀這個聞名的古堡，另外還安排了管風笛樂隊穿著傳統的蘇格蘭格子裙裝行進演奏。7/8 晚上議程結束後並安排一場音樂饗宴，在離議場不遠處的古老教堂 St Mary's Chapel 欣賞合唱團演出，部份曲目為耳熟能詳的傳統蘇格蘭民謠如羅莽湖邊(Loch Lomond)及斯開船歌(Skye boat song)等，天籟美聲餘音繞梁，讓我們感動不已。對主辦單位熱心推展蘇格蘭文化的用心更是讚歎佩服。

二、與會心得

我印象最深刻的主题當屬第二天早上的「Technology」session，包括 zebrafish mutation project (ZMP)，和由 Dr. Shawn Burgess 主導的 genome-wide knockout library，利用反轉錄病毒感染及 high-throughput 的 illumina sequencing 方法定位病毒插入點，冷凍保存此鑑定好的精子用以體外授精，即可取得帶有任何想要突變序列的魚種。兩年前我曾向 Dr. Burgess 要一些 yeast one hybrid 所須的試劑，用來全基因體篩選未知的轉錄因子的 DNA 結合序列，他非常慷慨且快速的提供了他們的質體、菌株等，並附上詳細的說明。如今他們又開發出 genome-wide knockout library 的生產技術，不禁佩服其團隊的研發能量。另外在倫敦 MRC Dr. Xu 開發細胞標定技術，利用基因轉殖多色螢光報導基因(brainbow cassette)做成 fishbow(神經系統表現多色螢光魚)，用來作為細胞譜系或行為的追蹤。還有 Dr. Todd Evans 以 polysome profiling 來探討蛋白質轉譯調控機制，先以蔗糖梯度離心分離細胞中的 polysome，再純化其上之 RNA 做 deep RNA-sequencing，即可定量所有正在轉譯的基因。其他如利用 neurospora Q system 來研究基因調控，及使用 photocontrol (caged ligand which can be activated by photons)來研究單一細胞蛋白質活性等，都是非常新的創意，勢必引領更多 genome-wide，high throughput 技術應用的潮流。

另外我對有關肌肉細胞分化發育相關的研究報告也印象深刻。來自日本的 Dr. Hirata 探討慢肌快肌發育的時期，讓我了解 24hr 胚胎的 coiling 動作由慢肌主導，48hr 胚胎的 burst swimming 由快肌加一點慢肌主導，且肌肉的運動與神經傳導也有關聯，因此觀察到的肌肉缺陷要先確定

defect 是在 muscle 還是神經傳導。此外，myoseptum (myotendinous junction)的缺陷可由膠原蛋白基因 Col22a1 缺失引起，會造成 muscle weakness, failure to hatch, curve tail, U-shape somites 等表型，看起來與不明原因的人類肌肉萎縮症有關聯。由於我們研究的 Irx11 基因缺失也會造成相似的表型，而 irx11 基因在小鼠缺失會造成肌腱發育異常，很可能在斑馬魚可以研究其相關的機制。

三、考察參觀活動(無是項活動者略)

大老遠從台灣來到蘇格蘭，當然要順便參觀一下此地的風情才不枉此行。我們利用空檔參觀了愛丁堡大學，並徒步逛了整個非常有特色的愛丁堡市區，包括王子街及周圍的公園，國家藝廊等。另外我們也自費參加了一天的蘇格蘭高地之旅，參觀 Sterling 古堡、Loch Lomand 和國家公園。

四、建議

無

五、攜回資料名稱及內容

第七屆歐洲斑馬魚會議議程、論文摘要

六、其他

無

Functional analysis of zebrafish muscleblind-like 3

Huichin Pan¹, Chieh-Wen Lin¹ and Kuang-Ming Hsiao²

¹ Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung,

²Department of Life Science, National Chung Cheng University, Chia-Yi, Taiwan

Muscleblind-like (MBNL) is a family of proteins that participate in regulation of tissue-specific alternative splicing. Misregulation of MBNL activity in humans leads to RNA-mediated pathogenesis. We have cloned and characterized the structure and expression of three *mbnl* paralogues in zebrafish to study their function during embryogenesis. This study focused on *mbnl3*. Unlike *mbnl1* and *mbnl2*, which were both maternally expressed, *mbnl3* transcripts were barely detected until late pharyngula stage (48 hpf). However, *mbnl3* transcripts were abundant in most adult tissues. Using whole-mount *in situ* hybridization, expression of *mbnl3* was observed in 48 -120 hpf larvae, with stronger signals in the head region. Knockdown of *mbnl3* did not result in overt morphological abnormalities except in pharyngeal arches, where Alcian blue staining revealed that cartilage development was affected. RT-PCR analysis indicated that the splicing patterns of *clc-1* and expression levels of *myoD* and *myogenin* were not changed. On the other hand, microinjection of *mbnl3* cRNA into the embryos resulted in defective phenotypes. At 48 hpf, a significant portion of the injected embryos displayed shortened and curved body axis, and severely disorganized somites. When introduced into C2C12 cells, zebrafish *mbnl3* repressed endogenous MyoD expression in growth medium and was able to inhibit cell fusion in differentiation medium, accompanying with change of *mef2a* splicing pattern and reduction of myogenin and MHC protein expression. Dual-luciferase reporter assay further revealed that *mbnl3* down-regulated *myoD* promoter activity in the fish embryos. These data suggest that zebrafish *mbnl3* may interfere with muscle differentiation through the MyoD-dependent pathway.



21st April 2011

Dear Dr. Huichin Pan,

The 7th European Zebrafish Meeting 2011

EICC, Edinburgh

5th July – 9th July

Poster Number: P1-75

Title: Functional analysis of zebrafish muscleblind-like 3

Session: Session 1 & 2

Following the acceptance of the above abstract for poster presentation I am pleased to provide you with your poster number and session. Dedicated viewing sessions have been created for authors to discuss their posters with delegates. Please stand by your board during the sessions in which you have been allocated above.

The times of the sessions are as follows:

Poster Session 1 – Wednesday 6th July 13:00–15:00

Poster Session 2 – Wednesday 6th July 18:30–20:00

Poster Session 3 – Thursday 7th July 13:00–16:00

Poster Session 4 – Friday 8th July 12:30 – 16:00

Posters in sessions 1 and 2 can be put up from 12.00hrs on Tuesday 5th July and should be removed after poster viewing session 2 on Wednesday 6th July.

Posters in sessions 3 and 4 can be put up from 08.00hrs on Thursday 7th July and should be removed after 16.30hrs on Friday 8th July.

The organisers cannot be held responsible for any posters left after their allocated sessions.

The posters should remain on display throughout both days of their session.

Poster boards are 1m wide by 2m high (portrait style). It is recommended that displays do not exceed 1.5m in height. Velcro tabs to hang your poster up with will be available at the venue. No screws or double-sided adhesive tape will be allowed as they damage the boards.

1m

1.5m

Please remember you must be registered to attend the Meeting in order to present your poster.

To register for the conference online and to keep up to date with the meeting programme please see the meeting web site at www.zebrafish2011.org.

If you have any queries please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely,

Lotte Kerr

Assistant Event Planner
In Conference Ltd
4-6 Oak Lane
Edinburgh
EH12 6XH
Tel: +44 (0) 131 339 9235
Fax: +44 (0) 131 339 9798

國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：100年6月15日

計畫編號	NSC 97-2320-B-040-013-MY3		
計畫名稱	Muscleblind 家族蛋白質的功能研究		
出國人員 姓名	涂麗君	服務機構 及職稱	中正大學分子生物所博士班一年級
會議時間	2011年5月18日 至 2011年5月21日	會議地點	沖繩那霸市
會議名稱	(中文)第四十四屆日本發育生物學年會 (英文) 44 th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists		
發表論文 題目	(中文) <i>mbnl1</i> 於斑馬魚早期胚胎發育之功能性分析 (英文) Functional studies of <i>mbnl1</i> in early zebrafish development		

一、參加會議經過

去年11月潘老師收到日本發生學會JSDB的邀請並告知我們今年5月底的會議，因此我便主動向老師提起我想與會的意願。這次會議在日本最南端沖繩那霸的Okinawa Convention Center展開，並且與亞太發育生物學聯盟一同合辦。因此聚集了許多日本與亞太區的學者，同時也遇到許多台灣來的老師與學生，包括中研院分生所的鍾邦柱教授與台大細生所的吳益群教授等。而我則與台大蔡懷禎教授的博士後研究員和其實驗室的學生一同前往，在5/18開會的第一天早晨即到達那霸市區。會議的第一天主要有兩個workshops以日語為主，因此我們沒有參加而是各自前往飯店check in。

第二天早上有三個Symposium，分別為Neural development: from circuits to behavior、Morphogenesis based on cell polarization與Cutting-edge approaches to quantitative understanding of developmental biology。在完成報到手續後，我挑了幾個比較有興趣的題目參加。而我送交報名的摘要被安排在這天以壁報展示，並且在下午16:30~18:30有一個Discussion time。若發表壁報的作者為學生身分，在壁報張貼時會特別標記，並且列入優秀壁報的候選名單。可能是學

生身分加上外國人的關係，主動來攀談的多為台灣的學生或認識的老師。台灣的師長與學長姐們也提供很多實驗上的方法，以及學術上的交流。而其中有3位日本年輕學者與學生對我的研究內容感興趣，同時也給予不錯的意見並交換聯絡方式。雖然我們的語言都不是彼此的母語，卻又很努力的用英文溝通好讓對方了解，真的是個很棒的經驗。

爾後兩天的會議除了精彩的演講與壁報展示外，還有幾個Workshops以及Oral Presentation。由於前一天已經展示完自己的成果，所以這兩天是以較輕鬆的心情參加。演講的部分分別有來自澳洲昆士蘭大學的Bernard Degnan，解說他們在海綿基因體及海綿胚胎的研究成果。還有來自史丹佛大學的Matthew Scott及劍橋大學的Williams Harris帶來plenary lectures的精彩演講。以及大師級人物Matthew Scott從發育及疾病的角度切入的Hedgehog signaling pathway，並從演化的方向來思考問題讓人相當敬佩。Oral Presentation的部分大多為年輕學者及學生的研究發表，雖然日本人普遍英文發音並不標準，但他們非常詳細說明自己的成果時相當有自信且熱忱，是我學習並嚮往的目標。主辦單位在會議的第三天晚上有安排一個Reception，然而這個部分非本國人需要付費，因此我與學長們便沒有參加。

二、與會心得

此次會議印象最深刻的是與Ciliary biology、LR asymmetric morphogenesis的相關議題。整個會議包括Symposium、Workshops以及Oral Presentation將近1/3都與此有關。剛好我的研究裡看到相似的現象卻又一知半解，此次的會議除了讓我對該領域有初步的了解外，也不得不佩服日本在發育生物學上的發展。就像是在短時間內研讀了大量的文獻，除了增廣自己的見聞，也同時讓我在自己的研究上得到很好的方向與啟發。

三、考察參觀活動(無是項活動者略)

海洋博公園內的美之海水族館，具有全世界第二大的巨大水潮。該水槽以引進黑潮為名並重現沖繩大海深處的海底世界。在這裡，可以看到長達8.5米的鯨鯊、以及魷魚中最大的蝠魷。到沖繩以前就久聞其盛名，因此這此與會我們趁著會議空檔，便程著巴士前往這百聞不如一見的海洋博物館。

四、建議

無

五、攜回資料名稱及內容

第四十四屆日本發育生物學年會議程

Tu L-C, Hsiao K-M, and Pan H. 2010. Functional studies of mbn11 in early zebrafish development. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. P. 1086

六、其他

無

Functional studies of *mbnl1* in early zebrafish development

Li-Chun Tu^{a,b}, Kuang-Ming Hsiao^a, Huichin Pan^b

^aDepartment of Life Science and Institute of Molecular Biology, National Chung Cheng University, Chia-Yi 621, Taiwan

^bDepartment of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung 402, Taiwan

ABSTRACT

Muscleblind (Mbnl) is a family of proteins that participate in regulation of tissue-specific alternative splicing. They bind to RNA through a conserved Cys3His zinc finger domain. Misregulation of Mbnl activities in human leads to pathogenesis. Previously we have identified three paralogous *mbnls* in zebrafish (*mbnl1*, 2, and 3) and characterized their genomic structures and splicing isoforms. This study focuses on functional analysis of zebrafish *mbnl1*. During fish embryogenesis, expression of *mbnl1* was found predominantly in ventral mesoderm, presumptive blood, heart, otic vesicle and pharynx. Antisense morpholino knockdown of *mbnl* results in morphants with defects in eyes, blood circulation, heart looping, arch cartilages, muscle and swim bladder formation. The *mbnl1* morphants also displayed circular swimming and fused otoliths. These defects could be partially rescued by co-injection of *mbnl1* cRNA. Further analysis of the morphants by *in situ* hybridization or immunohistochemical staining revealed that normal heart jogging and muscle fiber organization were affected at early stages, suggesting that *zmbnl1* function is required for proper development of these tissues. In consistent with the observed phenotypes, we found that the splicing patterns of *tnnt2*, *clcn1*, *vincullin*, *mef2ca* and *mbnl1* pre-mRNAs were altered in the morphants. These data suggest that zebrafish *mbnl1* protein is crucial for early fish development possibly through the regulation of specific gene splicing.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/28

國科會補助計畫	計畫名稱: Muscleblind 家族蛋白質的功能研究
	計畫主持人: 潘惠錦
	計畫編號: 97-2320-B-040-013-MY3 學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

97 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：潘惠錦		計畫編號：97-2320-B-040-013-MY3					
計畫名稱：Muscleblind 家族蛋白質的功能研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	3	3	100%		
		專書	1	1	100%		碩士論文
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	2	2	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	1	1	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	3	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	3	3	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>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。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 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）

本研究結果顯示，mbn11 或 mbn12 的缺失可以使斑馬魚胚胎出現與人類強直型肌肉萎縮症類似的病徵，因此可以作為此疾病的一個簡單動物模式，探討這些病徵與相關基因的調節及特異性剪接異常之關聯，進一步更可以以此模式進行小分子藥物的篩選，作為治療疾病的初步評估。除此之外，我們也觀察到病徵以外的表型，顯示 mbn1 可能參與更多的細胞發育程序，例如左右對稱的調控及血液細胞分化的調控，在之前的文獻不是沒有發表過就是著墨甚少，此部分可能可以延伸探討。在 mbn13 的部份我們其對早期胚胎發育功能不明顯，以細胞模式發現 mbn13 反而可以經由 MyoD-dependent 途徑來抑制肌肉細胞進行分化。更新的結果顯示 mbn13 可能與細胞週期調控及細胞老化過程有關，這些都是全新的發現，進一步研究對於 mbn1 家族蛋白質在細胞內的生理功能將有更全面性的了解，不論在疾病機轉或基礎發育方面都提供很好的學術及應用價值。