

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

CAG 重複序列在 RNA 引導之致病機轉扮演角色的探討(第 2 年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2320-B-040-040-MY2
執行期間：96 年 08 月 01 日至 97 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

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：林炯志
碩士班研究生-兼任助理人員：莊函霓
碩士班研究生-兼任助理人員：涂麗君
大專生-兼任助理人員：潘駿
大專生-兼任助理人員：田玉珊

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97 年 10 月 28 日

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

CAG 重複序列在 RNA 引導之致病機轉扮演角色的探討

Investigation of the role for CAG repeats in RNA mediated pathogenesis

計劃編號：NSC 95-2320-B-040-040-MY2

執行期限：95 年 8 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

主持人：潘惠錦 中山醫學大學 生物醫學科學系

計畫參與人員：蕭光明、陳倫魁、林炯志、何蕙如、張庭皓、田玉珊、潘駿

一、中文摘要

由擴增的 CAG 重複序列所編碼的多麩胺酸長鍊一般被認為是造成多種人類神經退化性疾病的主要致病原。然而，部份這類疾病具有非常相似的臨床症狀卻並不含有多麩胺酸擴增。之前我們在實驗中顯示擴增的 CTG 及 CAG 重複序列位於 EGFP 基因的 3'UTR 皆可導致轉殖基因小鼠和線蟲的肌肉產生病變。進一步以細胞模式研究發現，轉譯和非轉譯的 CAG 重複序列皆可在 Hela 細胞內形成 RNA 聚集，並且，在強直型肌肉萎縮症的 RNA 致病機轉中扮演重要角色的 muscleblind 蛋白質與這些 RNA 聚集出現在共同位置，暗示 CAG 重複序列疾病可能同時有蛋白質和 RNA 層次的 gain-of-function 毒性機制參與致病機轉。由於所有已知的 CAG 重複序列疾病都會影響中樞神經系統，在本研究中，我們建立了基因轉殖鼠以表現神經專一性的轉錄物，內含 200 次 CAG 重複序列在 EGFP 基因的編碼區或 3'UTR 區。可惜轉殖基因的表現量在大部份的小鼠族系都相當低，只有用 RT-PCR 可以偵測到表現，以北方點墨和西方點墨法都無法測到其 RNA 和蛋白質的表現，除了在一個表現 EGFP-多麩胺酸融合蛋白的小鼠族系以外。這個族系的小鼠在 6 個月大以前即發展出運動失調和 Purkinje 細胞退化的現象。在 Purkinje 細胞層還可觀察到含多麩胺酸的 EGFP 蛋白形成聚集。相反的，表現非編碼區 CAG 重複序列的轉殖基因小鼠並無明顯的表型改變。沒有表型出現可歸因為轉殖基因表現量過低，或者是缺少特定的組織專一性因子。為進一步釐清此點，我們將不同長度的 CAG 重複序列送入小鼠肌纖維母細胞(C2C12)以及神經母細胞(Neuro-2a)中，發現 RNA 聚集會在兩種細胞內形成，但是 muscleblind 蛋白質只會在 C2C12 細胞內與 RNA 聚集同時出現。並且，分析其細胞形態及分化指標的表現得知，C2C12 細胞的分化會受到 CAG 擴增序列抑制，而 Neuro-2a 細胞則否。在分化的 C2C12 細胞，RYR AS1、Mef2 和 vinculin 等基因的 RNA 剪輯型式受到 CAG 擴增序列的影響而改變。這些結果暗示特定的組織專一性因子對 CAG 重複序列在 RNA 層次的 gain-of-function 毒性機制扮演重要的調節角色。

關鍵詞：CAG 重複序列、基因轉殖鼠、RNA 致病、組織特異性、細胞分化

ABSTRACT

Expanded CAG repeats encoding long polyglutamine tract are the widely accepted pathogenic agents in a variety of human neurodegenerative disorders. However, some of these disorders do not have polyglutamine expansion yet they display very similar clinical presentations. Previously, we showed that expanded CTG and CAG repeats in the 3'UTR of *EGFP* both had pathogenic effects in muscle of transgenic *C.elegans* and mice. Moreover, we found that RNA foci were formed in Hela cells expressing both coding and noncoding CAG expansions and that muscleblind-like (MBNL) proteins which mediate RNA pathogenesis in myotonic dystrophy were colocalized to these foci. These results suggested that expanded CAG repeats may exert toxic gain-of-function mechanisms not only at protein levels but also at RNA levels. Since all known CAG repeat disorders affect the central nervous system, in this study, we established transgenic mice expressing neuro-specific transcripts with 200 CAG repeats in the coding region or 3'UTR of the *EGFP* gene. The expression levels of the transgenes were low in most lines that they were only detectable by RT-PCR. Both Northern and Western Blots fail to detect the expression except in one line that expresses *EGFP*-polyglutamine fusion protein. This line of animals developed ataxia and Purkinje cell degeneration by 6 months of age. Polyglutamine-containing *EGFP* protein form aggregates in the Purkinje cell layers. In contrast, there were no noticeable phenotypic changes in the transgenic animals with noncoding CAG repeats. The lack of phenotype could be attributed to low levels of transgene expression or the absence of certain tissue-specific factors. To further clarify this issue, we transfected mouse myoblast cells (C2C12) and mouse neuroblast cells (Neuro-2a) with different lengths of CAG repeats. We found that RNA foci were formed in both cells expressing expanded CAG repeats, but the MBNL protein was only colocalized to the foci in C2C12 cells. Moreover, differentiation of C2C12 cells, not Neuro-2a cells, was inhibited by expanded CAG repeats, as judged by cell morphology and expression of several differentiation markers. The splicing patterns of *RYR AS1*, *Mef2* and *vinculin* genes were also affected in differentiated C2C12 cells with CAG expansion. These results suggest that tissue-specific factors play important roles for the toxic gain-of-function mechanism of expanded CAG repeats at the RNA level.

KEYWORDS: CAG repeats, transgenic mice, RNA pathogenesis, tissue-specific, cell differentiation

二、緣由與目的

三聯核酸重複序列疾病的研究，近年來有相當好的進展，目前部份疾病的致病機制也已逐漸清楚。以發生在轉譯區內的 CAG 重複序列而言，其重複次數大多在 35 至 150 之間；雖然位於不同的基因座，且影響到不同的神經元，但其蛋白質都具有相同的 polyglutamine 擴增，應由類似的分子機制造成。多數這類疾病基因的 loss-of-function mutation 並不表現出病症，其致病原因可能由 toxic gain-of-function 機制而來，即擴增突變後的蛋白質因結構的改變造成對神經元產生毒性。polyglutamine 擴增形成核內包涵體 (nuclear inclusions)，改變 protein folding homeostasis；這些 misfolding protein 被 ubiquitin target，帶至 proteasome 卻又無法被降解 (degradation)，阻塞了細胞內正常的 proteasome 的功能，因而造成細胞的傷害。除此之外，misfolded polyglutamine 擴增也會吸引 (sequester) 其它含有小段 polyglutamine 的蛋白，包括一些 transcriptional coactivator 如 CREB-binding protein 等，使轉錄調節失常而造成細胞的毒性，特別是神經系統方面出現退化(1-3)。

由非轉譯區重複序列擴增所導致的疾病，已知的分子致病機制包括 loss-of-function 及 RNA gain-of-function 二種型式。前者指的是擴增突變影響到三聯核酸重複序列所在基因的表現。如 FRAXA，其過度甲基化的 CGG 擴增序列會降低 *FMR1* 基因轉錄使得 *FMR1* 蛋白質缺乏(4)；而 FRDA，其 intronic GAA 擴增突變會干擾 mRNA 之形成因而及大幅減少蛋白質產物的量(5)。另一方面，利用基因轉殖鼠表現 expanded (CUG)*n* repeats 的研究顯示，不論肌肉細胞內擴增突變 (CUG)*n* tract 是否位於疾病基因 *DMPK* 上，皆會造成 DM 主要臨床症狀肌強直 (myotonia) 及肌病變 (myopathy) 的情形，顯示 expanded (CUG)*n* repeats 會導致 RNA gain of function 的作用(6, 7)。目前已知 expanded (CUG)*n*-RNA 的作用可能透過一些 RNA binding protein，如 CUGBP1 (8) 及 muscleblind (9, 10) 等，影響其他 RNA 的 splicing，而造成 DM 多系統性 (multisystemic) 的症狀。已被找出的異常 splicing 基因，包括 cardiac Troponin T (cTNT) (11)、insulin receptor (IR) (12)、Chloride channel type 1 (ClCN-1) (13)，這些基因在 DM 病人的細胞內 splicing pattern 與正常人不同，因而造成心臟傳導異常、糖尿病、肌強直等症狀。另一證據是含有擴增 CUG 或 CCUG 之 RNA 會在病人的細胞核內形成聚集 (RNA foci) (14)，而 muscleblind 也會出現在此 RNA foci 中 (15, 16)。muscleblind 剔除小鼠的肌肉、眼睛以及 RNA splicing 都出現與 DM 病人類似的異常(17)，更進一步證實了 DM 的表徵可藉由擴增 RNA 對特定 RNA-binding protein 的 sequestration 而產生。

除了上述 DM 以外，其它非轉譯區三聯核酸重複序列疾病如 SCA8、SCA12、HDL2 等，目前對其分子機制只有初步的了解。值得注意的是最近對於 FXTAS (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome) 的研究。*FMR1* 基因的 CGG repeats 若在 200 次以上，會造成智障；而 CGG repeats 若在 60-200 次之間 (稱為 permutation)，則會導致另一疾病 FXTAS，其症狀是病人在年紀較大時會出現神經退化及卵巢失能 (ovarian failure)，目前的證據顯示此種神經退化症狀是由 RNA-mediated 的致病機制所引起。Jin 等人以果蠅複

眼表現 90 次重複的 CGG repeats 在 *EGFP* 基因的 5'-UTR，證實此果蠅複眼可產生漸近式退化(progressive degeneration)，且細胞內會形成聚集(inclusions) (18)；而 CGG knock-in 小鼠模式表現 100 次重複的 CGG repeats 在 *FMR1* 基因的 5'-UTR，也觀察到類似的結果 (19)。

一些研究報告支持 CAG RNA 可能在致病機制上扮演一角色。含 CAG, CUG, CGG, CCG 重複序列之 RNA 已經被證實會形成"hairpin"結構，而 RNA 結構與疾病造成可能有密切關係(20)；其中已知 rCUG 重複可造成 DM，rCGG 重複可造成 FXTAS。曾有報告指出，CAG 重複序列之 RNA 會與 CAG-binding protein 結合(21)。擴增的 CAG RNA 也如同擴增的 CUG RNA 一樣，可以形成核內 RNA foci，且此 foci 與細胞內的 muscleblind 蛋白質位置重疊(colocalize)，但是對下游基因 alternative splicing 的錯誤調節則只在表現 CUG RNA 的細胞發生(22)。以果蠅做的 SCA1 (polyglutamine disease)動物模式去篩選可能對神經退化表型修飾的分子，找到了其中一類 modifier 是屬於 RNA-binding protein (23)，顯示 RNA processing 的變異可能參與 SCA1 的致病機制。最近一篇報告更明確指出，RNA toxicity 是 polyglutamine 疾病致病的可能原因之一(24)。

先前我們實驗室建立了基因轉殖小鼠模式，將不同長度的 CAG 重複序列(CAG₀、CAG₂₃、CAG₂₀₀)接在綠螢光蛋白 *EGFP* 基因之 3'-UTR，並以 *gamma-sarcoglycan (GSG)* 基因之驅動子來驅動 *EGFP* 在小鼠肌肉專一性表達。研究結果顯示，3'-UTR 的 CAG 擴增序列(CAG₂₀₀)可造成小鼠生理缺陷，而不同的缺陷對重複序列的長度有不同的敏感性。這個結果與前述 5'-UTR CGG repeat RNA 可對果蠅複眼造成毒性的觀察不謀而合，暗示擴增的 CAG 重複序列也可以透過 RNA gain-of-function 的作用機制而致病。然而 McLeod 等人以果蠅為模式，卻提出不同的結果(25)。他們分別將重複次數不等的 CAA 和 CAG 重複序列表現在 coding region，以及重複 93 次的 CAG 序列表現在 3'UTR，發現只有可以轉譯出大於 40 次(pathogenic threshold)以上的 polyglutamine 的序列，即 CAA₉₄ 和 CAG₉₉，可以產生眼睛的 phenotype；只能轉錄不能轉譯的 rCAG₉₃ 則完全對細胞無任何毒性。CAA 和 CAG 都轉譯 glutamine 胺基酸，但差別是 CAA 重複序列在 RNA 層次不像 CAG 重複序列會形成二級結構，因此更進一步認定 RNA-mediated pathogenesis 在此系統中不扮演角色。探究此篇論文與我們先前研究結果的差異，主要來自兩種可能。第一是使用的實驗系統不同；昆蟲的眼睛對照哺乳類小鼠的肌肉，是否有可能因物種或組織特異性的差異造成 RNA-mediated 途徑下游分子不同甚至缺乏，有待進一步探討。第二點是使用的 CAG repeat 長度不同；一般 polyglutamine 疾病的 CAG 重複大於 40 以上即可出現表徵，但位在非轉譯區的重複序列通常要大於 150 次才會致病，因此有可能必須在較長的重複下才能看到 CAG RNA 的效應。

先前我們探討 3'端非轉譯區的 CAG 重複序列是作為 CTG 重複序列(DM 疾病)的對照，因此將轉殖基因接在肌肉性表達的 promoter (*GSG*)後面，以引導其表現，結果顯示位於非轉譯區的 CAG 重複序列可導致肌肉及生殖系統的生理缺陷，亦即 CAG repeat

RNA 可能參與疾病機制。但由於大部份 CAG 重複序列疾病(如 SCA、Huntington's)的病灶皆位於腦部，且引起神經元退化，因此若要探討在人類神經退化性疾病中 CAG RNA 所扮演的角色，較適當的方式是將此重複序列引導至腦部表現。在果蠅眼睛表現的 CAG RNA 雖不會產生病變，但無法確定是否是因組織特異性的差異或物種不同而使得表型不同。在本研究中，我們將非轉譯的 CAG 重複序列表現在小鼠神經細胞，同時為了作為對照，我們也將 CAG repeat 插入轉譯區內，同樣建立一組會產生 polyglutamine 的基因轉殖鼠。分析小鼠是否產生類似 polyglutamine 疾病的典型或部份表型。另一方面，為探討組織專一性因子對 CAG 重複序列毒性機制的影響，我們也將不同長度的 CAG 重複序列送入二種不同的細胞(肌纖維母細胞 C2C12 及神經母細胞 Neuro-2a)中，探討其形成 RNA foci、對細胞分化之抑制及對下游基因 splicing 所產生的影響。

三、結果與討論

(一). 轉殖基因鼠的建立及分析

1. 轉殖基因的構築與轉殖基因小鼠品系的建立

我們已經建構了一系列的轉殖基因，以小鼠的 Pcp2(L7) gene promoter 接 EGFP 基因，再插入不同長度的 CAG repeats 在 3'-UTR (U-CAG_n)及轉譯區(C-CAG_n) (Fig 1)。此 Pcp2 promoter 已被證實可導引基因在轉殖基因鼠小腦神經細胞含 Purkinje cell 的專一表達。轉殖基因委由長庚大學基因轉殖鼠核心實驗室和進階公司進行原核顯微注射。我們首先利用 PCR 和 Southern blot 的方式來篩選帶有轉殖基因的 F0 小鼠。將篩選帶有轉殖基因的 F0 小鼠和 NT 的小鼠交配產生 F1，其同一個 F0 小鼠所生的後代即是同一個族系。我們一共在 U-CAG₂₀₀ 的轉殖基因鼠建立了 5 個族系(22,25,27,10,30)； C-CAG₂₀₀ 的轉殖基因鼠建立了 8 個族系(9,35,48,23,43,47,64,65)；U-CAG₅₈ 的轉殖基因鼠建立了 5 個族系(581, 582, 583, 585, 586)；U-CAG₀ 的轉殖基因鼠建立了 2 個族系(01, 08)。從 Southern blot 分析發現轉殖基因鼠所帶有的轉殖基因 copy 數都不高，但在傳代之間重複序列有穩定保留。

2. 轉殖基因表達分析

由於我們所使用的 promoter 會專一性的表達小鼠小腦的 Purkinje cell，所以我們純化小腦組織的 RNA，做 RT-PCR，確認轉殖基因 EGFP 是否表現(EGFP； primer:nf2,cr0)，並進一步確認重複序列的長度是否正確。由 Fig 2A 的 RT-PCR 結果可以看出，在 U-CAG₂₀₀ 中以族系 22,27,30 的表現較佳，在 C-CAG₂₀₀ 中以族系 35,23,43,64 的表現較佳，在 U-CAG₀ 中以族系 01,08 的表現較佳，在 U-CAG₅₈ 中以族系 583,586 的表現較佳，因此之後就以這幾個族系做後續的實驗。在轉殖基因蛋白的表現上，我們除了利用 Western blot 的方式外偵測 EGFP 或是 poly-Q 的蛋白外 (Fig 2C)，也利用冷凍切片的方法，直接用螢光顯微鏡觀察綠螢光 EGFP 的表現。U-CAG₂₀₀ 品系 22,27,30 和 C-CAG₂₀₀ 品系 35,23,43,64 的轉殖基因鼠都有綠

螢光 EGFP 的表現，其中比較特別的是 C-CAG₂₀₀ 品系 23，其綠螢光 EGFP 的表現最強，而且有產生蛋白聚集的現象(Fig 2B)。在 Western blot 的實驗上也看到 C-CAG₂₀₀ 品系 23 的轉殖基因鼠，其轉殖基因有微量的表現，但其他品系的轉殖基因鼠卻偵測不到蛋白質的表現(Fig 2C)。

3. 轉殖小鼠表現型分析

觀察 U-CAG₂₀₀ (line 22,25,27,10,30) 和 C-CAG₂₀₀ (line 9,35,48,43,47,64,65)轉殖基因小鼠的外觀，包括體形大小，活動能力，生育的情況等，與正常的小鼠並無明顯的差異。除了 C-CAG₂₀₀ (line 23) 的轉殖基因鼠，在 8 週大時可以觀察到小鼠會有不自主顫抖的現象，而 12 週大時顫抖的情況會更明顯一直持續到死亡為止，大約 6 個月左右就會死亡，而且會伴隨白內障的情形發生(Fig 3)。另外，一旦發病之後，不論是公鼠或母鼠其生殖力有降低的情形。

4. 腦部 Purkinje 細胞之組織型態及病理分析

我們取小鼠的小腦，以石蠟切片的方式做 hematoxylin and eosin 的染色，發現 C-CAG₂₀₀ (line 23) 的轉殖基因小鼠 Purkinje cell 有缺少的情形 (Fig 4)。C-CAG₂₀₀ (line 23)轉殖基因鼠的表型異常，有神經退化的情形，跟先前的研究(polyglutamine disease)相符合。利用 Calbindin (D28K)做免疫組織染色觀察 Purkinje cell 的型態，同樣也觀察到 C-CAG₂₀₀ (line 23) 的轉殖基因小鼠的 Purkinje cell 有異常和分支不明顯的樹突，而且 Purkinje cell 的數目也有減少 (Fig 4)。但是在其他 line 的小鼠 (CAG0, U-CAG58, U-CAG200)其腦部 Purkinje 細胞之組織型態並無異常的情形。

5. U-CAG₂₀₀ 和 C-CAG₂₀₀ 轉殖基因小鼠的 Purkinje 細胞內 RNA foci 的情形

由 Fig 5 的結果顯示，不管是 U-CAG₂₀₀ 和 C-CAG₂₀₀ 轉殖基因小鼠，在 Purkinje cell 中並沒有看到含有 CAG 重複序列的 RNA，在核內形成堆積的情形。反而所偵測到的訊號，似乎是位在細胞質中。

(二)細胞模式分析

根據以上的結果顯示，位於 3'-端非轉譯區的 CAG 重複序列似乎對轉殖基因鼠沒有任何生理上的影響，而位於轉譯區的 CAG 重複序列則造成轉殖基因鼠有神經退化及白內障的病徵。此結果與我們的預期有很大的出入，推測原因至少可能有三個。一是由於所送入的轉殖基因表現量太少而導致沒有明顯的病徵 (此點與位於轉譯區的 CAG 重複序列的 23 這個品系的小鼠是轉殖基因蛋白表現較強而且有病徵出現的結果符合)；二是組織特异性因子的確扮演重要的角色，使得 CAG 重複序列在肌肉細胞和神經細胞出現不同的致病效果。為了改善轉殖基因表現量太少的問題，我們接著以 *in vitro* 的方式，利用 CMV promoter 在肌肉及神經細胞株 (C2C12,

Neuro-2a) 大量表現不同長度的 CAG 重複序列位於 EGFP 基因的 3'-端 UTR 或是轉譯區，繼續探討 CAG 重複序列是否在 RNA 層次上有毒性。

1. 質體構築及細胞轉殖

在 EGFP 基因的 3'-端 UTR 或是轉譯區，使用 CMV 的 promoter 來驅動不同長度的 CAG 及 CTG 重複序列 (Fig 6)。所建構完成的質體有 (CAG₀, U-CAG₂₀₀, C-CAG₂₀₀, U-CTG₂₀₀, C-CAG₅₈, U-CTG₅₈)。肌肉細胞株(C2C12)及神經細胞株 (Neuro-2a) 經 transfection 24 小時後，觀察帶有不同重複序列轉殖基因，綠螢光的表現情形及效率，發現在帶有 N3、U-CAG₂₀₀、C-CAG₂₀₀、U-CTG₂₀₀、C-CAG₅₈、U-CTG₅₈ 轉殖基因的細胞，綠螢光是均勻的在細胞質內表現，而帶有 C-CAG₂₀₀ 轉殖基因的細胞，綠螢光會在細胞質內產生聚集 (aggregate) 的現象而使綠螢光呈現點狀分布。另外也發現帶有 U-CAG₂₀₀、U-CTG₂₀₀、C-CAG₂₀₀ 轉殖基因的細胞，綠螢光的表現也有較弱的情形。

2. 細胞內 RNA 和蛋白質的表現

細胞經 transfection 24 小時後，以 Northern blot assay 發現轉殖基因 RNA 表現長度都如預期，但 U-CAG₂₀₀、U-CTG₂₀₀、C-CAG₂₀₀ 的表現量有下降的情形 (Fig 7A)。RT-PCR 結果也有同樣趨勢 (Fig 7B)。利用 Western blot assay，以 anti-polyQ 和 anti-EGFP 的抗體來偵測轉殖基因蛋白質的表現，發現轉殖基因蛋白質表現如預期，但 U-CAG₂₀₀、U-CTG₂₀₀ 和 C-CAG₂₀₀ 的蛋白質表現量也有下降的情形 (Fig 7C)。CAG 或 CTG 重複 200 次的序列在 UTR 會影響其前基因的表現，這一點與之前我們在轉殖基因鼠觀察的結果相符。

3. 細胞內 RNA foci 的形成及與 MBNL 蛋白質 co-localization 情形

細胞經 transfection 24 小時後，利用螢光原位雜交分析的方式，使用 Cy3 紅螢光標定的 anti-sense probe，在帶有 U-CAG₂₀₀、C-CAG₂₀₀、U-CTG₂₀₀、C-CAG₅₈、U-CTG₅₈ 的 C2C12 細胞核內發現有產生 RNA foci 的堆積情形 (Fig 8A)。結合螢光原位雜交分析及螢光免疫染色，更發現 MBNL 在 C2C12 細胞內與 RNA foci 有 co-localize 的現象 (Fig 8A)。然而在 Neuro-2a 細胞 RNA foci 不明顯，且 MBNL 和 RNA foci 出現的位置不在核內，並沒有在核內產生聚集或和 RNA foci 有 colocalize 的情形 (Fig 8B)。

4. 重複序列對細胞分化之抑制

為了探討重複序列 RNA 對細胞是否產生毒性，我們篩選穩定表現轉殖基因之細胞株，並誘導細胞進行分化。結果可見表現 U-CAG₂₀₀ 和 U-CTG₂₀₀ 的 C2C12 細胞，其細胞分化的形態明顯受到抑制 (Fig 9A)，反之，Neuro-2a 細胞的分化則無

明顯抑制之現象(Fig 9A)。觀察細胞分化之指標，在表現 U-CAG₂₀₀ 和 U-CTG₂₀₀ 的 C2C12 細胞中，myosin heavy chain (MHC)、myoD、myogenin 的表現皆下降；Mef2A 的 splicing pattern 亦改變(Fig 9B)。

5. 下游基因的 splicing pattern

進一步針對 C2C12 細胞內可能受影響的 MBNL 下游基因分析其 splicing pattern，發現只有 RyR AS1 及 metavinculin 的 splicing pattern 有明顯改變(Fig 10)，其他如 mtmr1，serca 等基因，並無顯著的 splicing 變化。這些結果顯示 CAG 重複序列擴增的確在 RNA 層次上可以對細胞產生毒性，但是其作用可能與組織特異性有關，造成在肌肉細胞有毒性而在神經細胞沒有影響。並且 CAG RNA 的作用可能並不完全和 CUG RNA 的作用相同，因而只有部份的下游基因受到影響。

四、成果自評

以上結果顯示 CAG RNA 重複序列的毒性確實與組織特異性有關，可能也與重複序列的長度有關。從細胞模式的研究結果，印證了之前我們的動物模式所得到的結果，即 CAG 重複序列(CAG200) RNA 在肌肉組織中具有毒性，可導致細胞分化受到抑制，此 RNA 可在細胞核內和 MBNL 蛋白質形成聚集並影響部份基因異常 splicing。而在神經細胞內雖然 CAG RNA 也會形成聚集但其不與 MBNL 共同出現，可能因此不具有可測得的毒性。今年 4 月刊登在 Nature 期刊的一篇報導首度揭露了 RNA 在 polyQ 疾病上扮演一角色，而 RNA 機轉和蛋白質機轉在重複序列擴增疾病中可能具有同等的重要性(24)。此篇報告是以果蠅為模式，若對照本研究結果，可能不同的物種(果蠅 vs 小鼠)、不同的長度、及不同的組織都要併入 CAG 擴增 RNA 是否具有毒性的考慮。本計畫的執行除了二位碩士班研究生的參與外(產生二篇碩士論文)，也同時訓練了四位大學部的同學，其中有二位獲得大專生專題研究計畫(已結案)。另外本計畫有二篇研討會論文海報發表(26-27)，其中一篇獲得優秀壁報論文獎(96 年生醫年會)(26)。目前結果正在整理準備投稿，期待可以有期刊論文發表。

五、參考文獻

1. Fischbeck, K.H. (2001) Polyglutamine expansion neurodegenerative disease. *Brain Res Bull*, **56**, 161-3.
2. Margolis, R.L. and Ross, C.A. (2001) Expansion explosion: new clues to the pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med*, **7**, 479-482.
3. Yamada, M., Tsuji, S. and Takahashi, H. (2002) Genotype-phenotype correlation in CAG-repeat diseases. *Neuropathology*, **22**, 317-22.
4. Jin, P. and Warren, S.T. (2000) Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, **9**, 901-8.

5. Sakamoto, N., Ohshima, K., Montermini, L., Pandolfo, M. and Wells, R.D. (2001) Sticky DNA, a self-associated complex formed at long GAA*TTC repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription. *J Biol Chem*, **276**, 27171-7.
6. 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**, 1769-73.
7. Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J.C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E. *et al.* (2001) Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet*, **10**, 2717-2726.
8. Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T. and Swanson, M.S. (1996) Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4407-4414.
9. Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A. and Swanson, M.S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J*, **19**, 4439-48.
10. Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S. and Thornton, C.A. (2001) Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet*, **10**, 2165-70.
11. 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.
12. Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., Dalton, J.C., Moseley, M.L., Ranum, L.P. and Day, J.W. (2004) Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am J Hum Genet*, **74**, 1309-13.
13. Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A. and Cooper, T.A. (2002) Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell*, **10**, 45-53.
14. 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.
15. Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J.D. and Hamshere, M.G. (2001) In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2766-71.
16. Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S. and Brook, J.D. (2002) Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet*, **11**, 805-14.

17. Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W. and Swanson, M.S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, **302**, 1978-80.
18. Jin, P., Zarnescu, D.C., Zhang, F., Pearson, C.E., Lucchesi, J.C., Moses, K. and Warren, S.T. (2003) RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*. *Neuron*, **39**, 739-47.
19. Willemsen, R., Hoogeveen-Westerveld, M., Reis, S., Holstege, J., Severijnen, L.A., Nieuwenhuizen, I.M., Schrier, M., van Unen, L., Tassone, F., Hoogeveen, A.T. *et al.* (2003) The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. *Hum Mol Genet*, **12**, 949-59.
20. Sobczak, K., de Mezer, M., Michlewski, G., Krol, J. and Krzyzosiak, W.J. (2003) RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5469-82.
21. McLaughlin, B.A., Spencer, C. and Eberwine, J. (1996) CAG trinucleotide RNA repeats interact with RNA-binding proteins. *Am J Hum Genet*, **59**, 561-569.
22. Ho, T.H., Savkur, R.S., Poulos, M.G., Mancini, M.A., Swanson, M.S. and Cooper, T.A. (2005) Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J Cell Sci*, **118**, 2923-33.
23. Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J. *et al.* (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, **408**, 101-106.
24. Li, L.B., Yu, Z., Teng, X. and Bonini, N.M. (2008) RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*, **453**, 1107-11.
25. McLeod, C.J., O'Keefe, L.V. and Richards, R.I. (2005) The pathogenic agent in *Drosophila* models of 'polyglutamine' diseases. *Hum Mol Genet*, **14**, 1041-8.
26. L.K. Chen*, H.R. He, and **H. Pan**. 2007. Investigation of the roles for CAG repeats in RNA-mediated pathogenesis. The 22th Joint Annual Conference of Biomedical Sciences (Taiwan) page185, P332. (*優秀壁報論文獎)
27. C.-C. Lin, L.-K. C, and **H. Pan**. 2008. Investigation of the relevance of 3'UTR CAG repeats and toxic gain-of-function mechanisms at the RNA level. The 23rd Joint Annual Conference of Biomedical Sciences (Taiwan) page158, P161.

FIGURES

Fig. 1

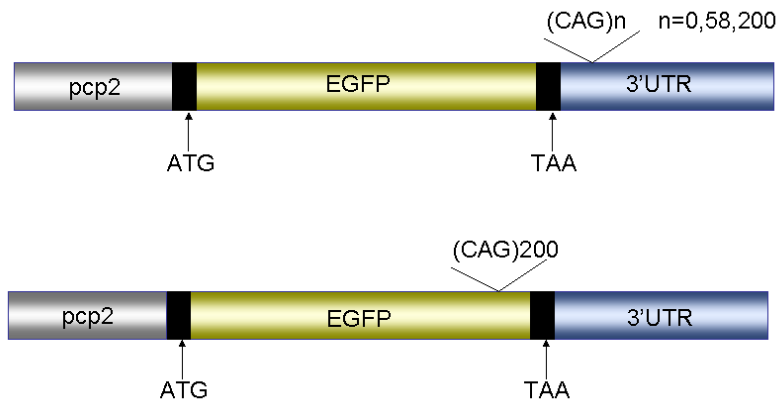
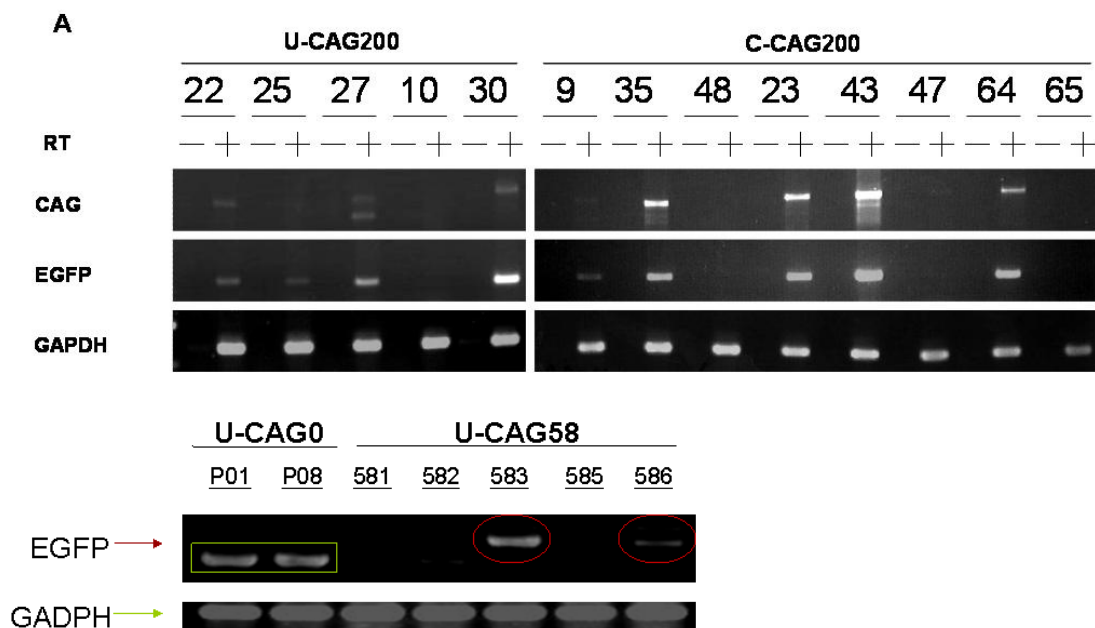


Figure 1. 轉殖基因質體的建構。利用綠螢光蛋白(EGFP)當作 reporter gene，以 Pcp2 的 promoter 驅動 EGFP (CAG₀)，分別在 EGFP 基因的 3'UTR 接上重複 58 或 200 次 CAG 的序列(U-CAG₅₈, U-CAG₂₀₀)或在 coding region 接上重複 200 次 CAG 的序列(C-CAG₂₀₀)。

Fig. 2



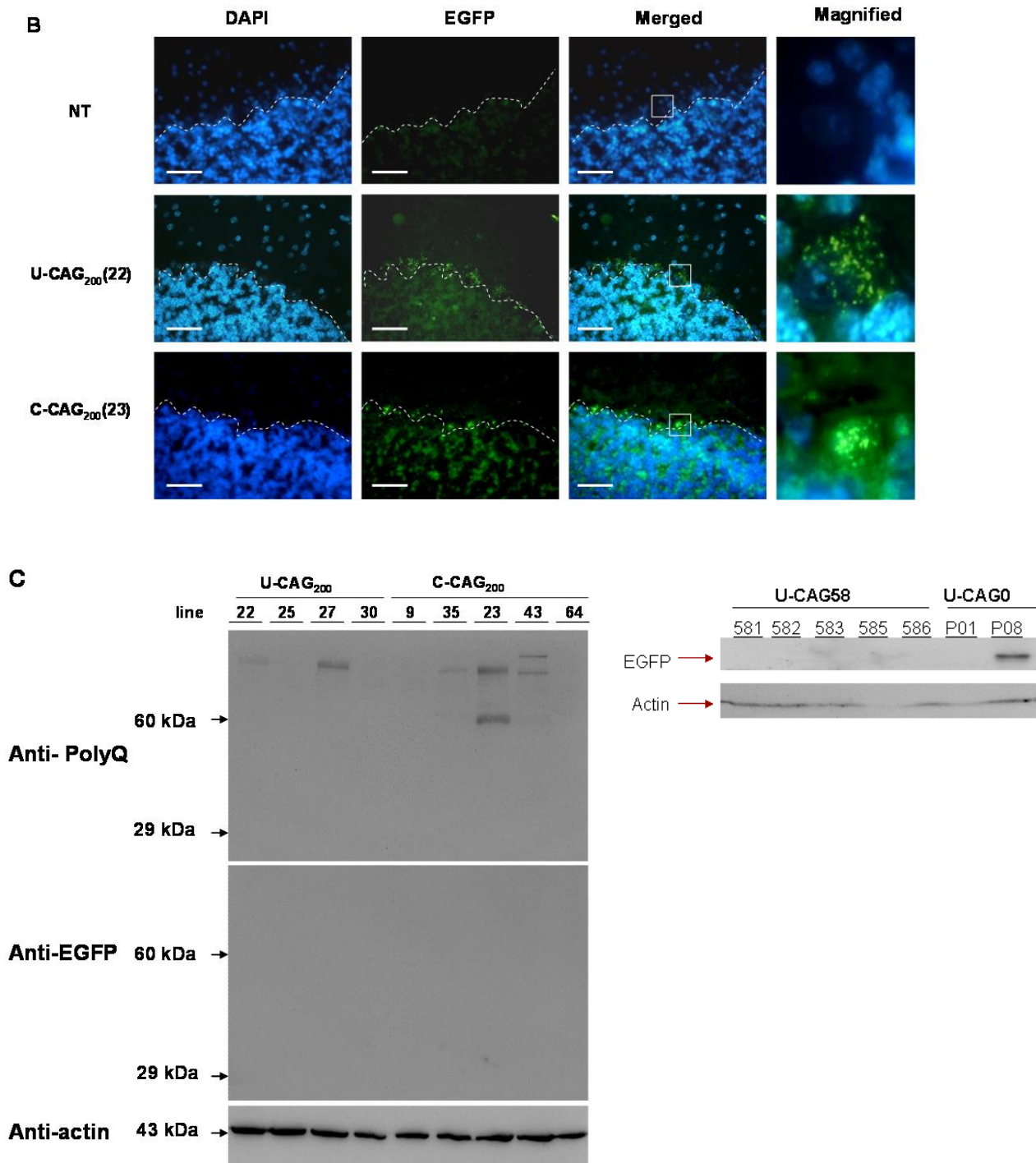


Figure 2. 轉殖基因的表現

(A) RT-PCR。取小鼠小腦的 RNA 反轉錄成 cDNA，利用 NF2 和 CR0 的 primer 經 PCR 放大後，帶有轉殖基因的小鼠會有 470bp(EGFP)的產物。利用 NF1 和 CR2 的 primer 經 PCR 放大後，有表現轉殖基因的小鼠會有 1200bp(CAG)的產物。GAPDH 為內源性控制組。RT-, RT+, 分別表示沒有轉 RT 和有轉 RT 的 RNA sample。(B) 小鼠的小腦冷凍切片 (12um)，利用螢光顯微鏡直接觀察轉殖基因 EGFP 蛋白表現的情形。DAPI 為細胞核的螢光染劑。NT, 非轉殖基因鼠。Bar, 50uM. Dotted line, Purkinje cell layer . Magnification x400 . (C) Western blot assay. 利用 anti-polyQ 和 anti-EGFP 的抗體來偵測轉殖基因鼠，轉殖基因蛋白的表現情形。利用 anti-polyQ 的抗體在 C-CAG₂₀₀ 的轉殖基因鼠會偵測到 60kD 的訊號。利用 anti-EGFP 的抗體在 C-CAG₂₀₀ 的轉殖基因鼠會偵測到 60kD 的訊號，

在 U-CAG₂₀₀ 的轉殖基因鼠會偵測到 29kD 的訊號。但結果只有 U-CAG0 (08) 有偵測到 EGFP 訊號，C-CAG₂₀₀ (23) 有偵測到 polyQ 訊號。anti-actin, 為 loading control.

Fig3

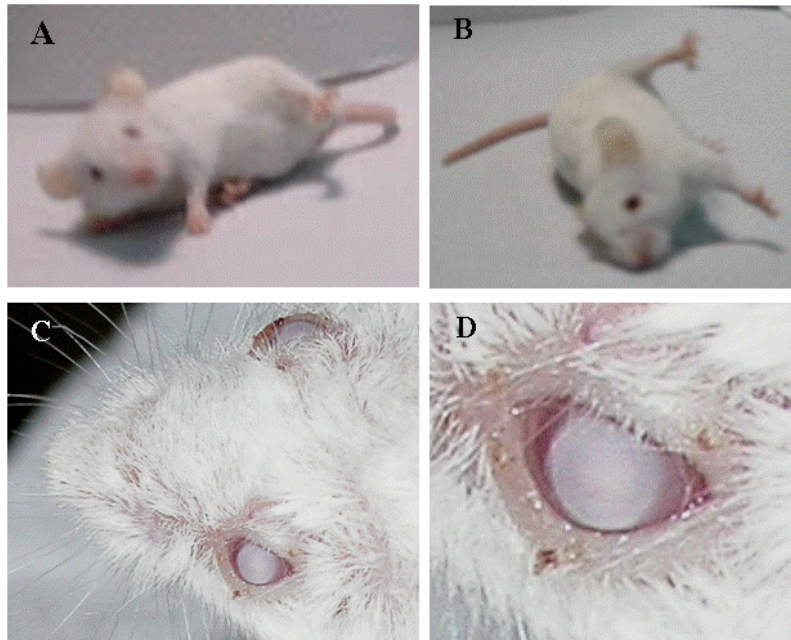


Figure 3. C-CAG₂₀₀ 轉殖基因鼠的表現型。(A、B) 在 C-CAG₂₀₀ (23) 的轉殖基因鼠三個月大時，開始出現運動失調的症狀，走路步伐不穩跌倒以及會不自主的顫抖。(C、D) 在 C-CAG₂₀₀ (23) 的轉殖基因鼠六個月大時會出現白內障。

Fig. 4

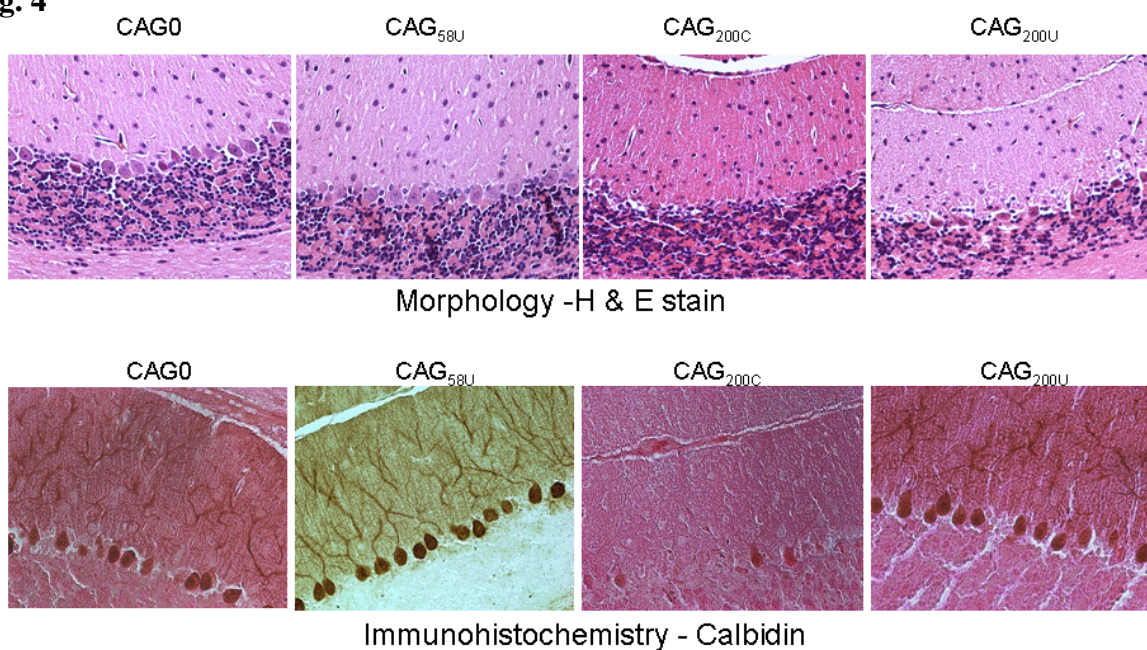


Figure 4. 轉殖基因鼠小腦組織及 Purkinje cell 細胞型態

上排: Hematoxylin and eosin 染色。下排: Calbindin (D28K)免疫組織染色。Calbindin 為 Purkinje cell 專一性表現之 marker。16 週大的 CAG0 轉殖基因鼠和 31 週大的 U-CAG₅₈、U-CAG₂₀₀ 轉殖基因鼠，有正常小腦皮質的結構和型態正常的 Purkinje cell。15 週大的 C-CAG₂₀₀(23)轉殖基因鼠，顯示出型態異常的 Purkinje cell 並有 Purkinje cell 數目減少的情形。Bar, 50 uM. Arrows, Purkinje cell. Magnification x400。

Fig. 5

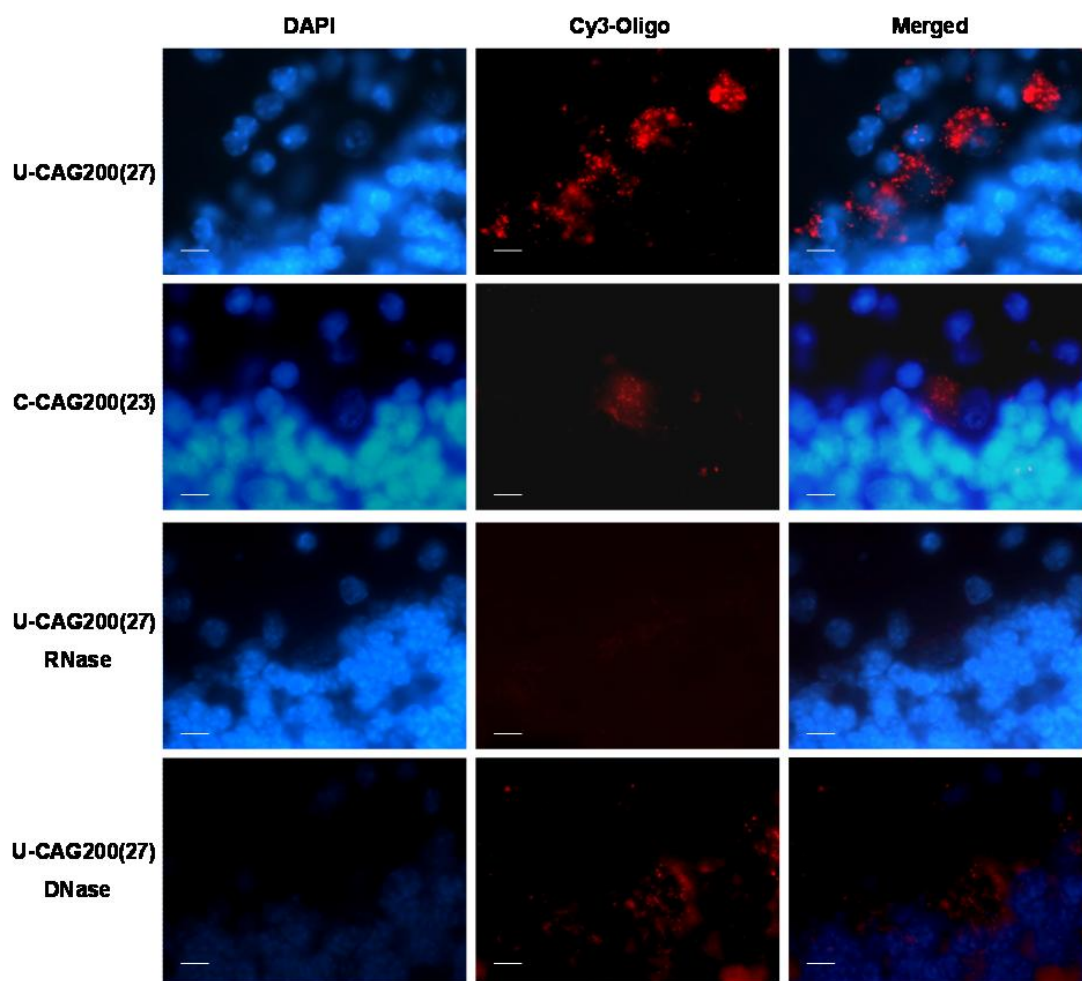


Figure 5. 轉殖基因鼠腦部 RNA foci 形成分析

小鼠小腦組織切片以 Cy3-(CTG)₁₀ 為探針進行螢光原位雜交分析。紅色訊號為探針標定螢光，藍色為細胞核。訊號出現在 Purkinje cell 細胞質位置。

Fig. 6

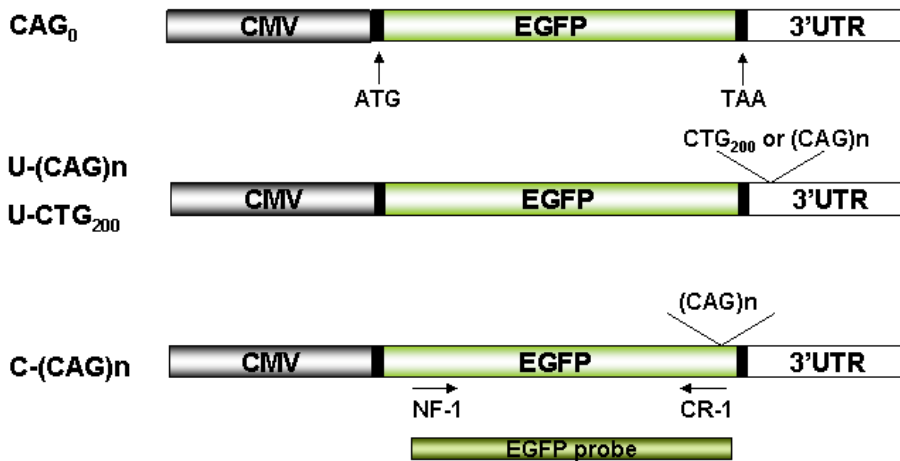
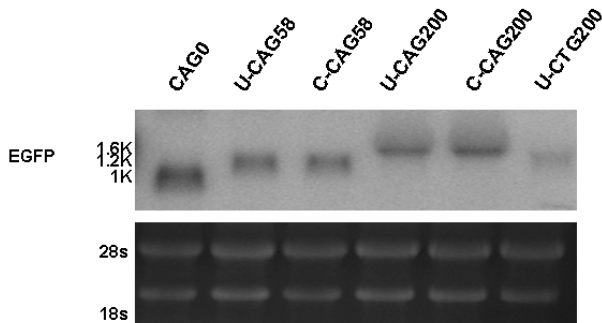


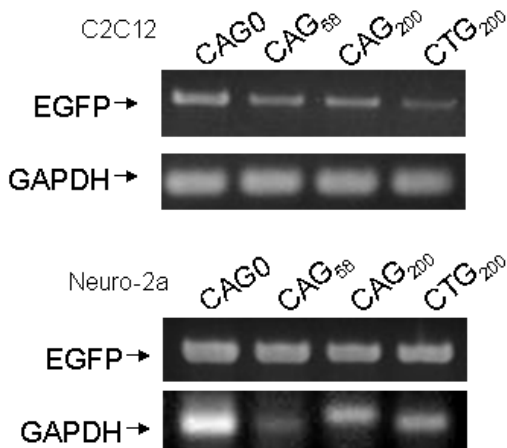
Figure 6. 細胞轉殖之重複序列質體建構圖。利用綠螢光蛋白(EGFP)當作 reporter gene，以 CMV 的 promoter 驅動 EGFP，分別在 EGFP 基因的 3'UTR 或 coding region 接上不同長度的 CAG 或 CTG 的序列。U-CAGn: 擴增的 CAG 重複序列位於 UTR; U-CTG200: 200 次 CTG 重複序列位於 UTR; C-CAGn: 擴增的 CAG 重複序列位於轉譯區。NF-1 及 CR-1 為 RT-PCR 分析及製備 Northern blot 探針所使用的引子。

Fig 7

A. Northern Blot



B. RT-PCR



C. Western Blot

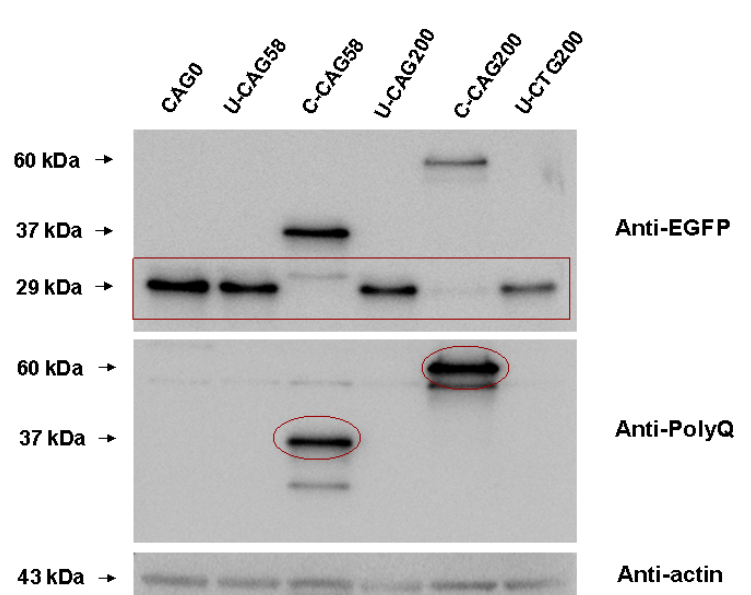
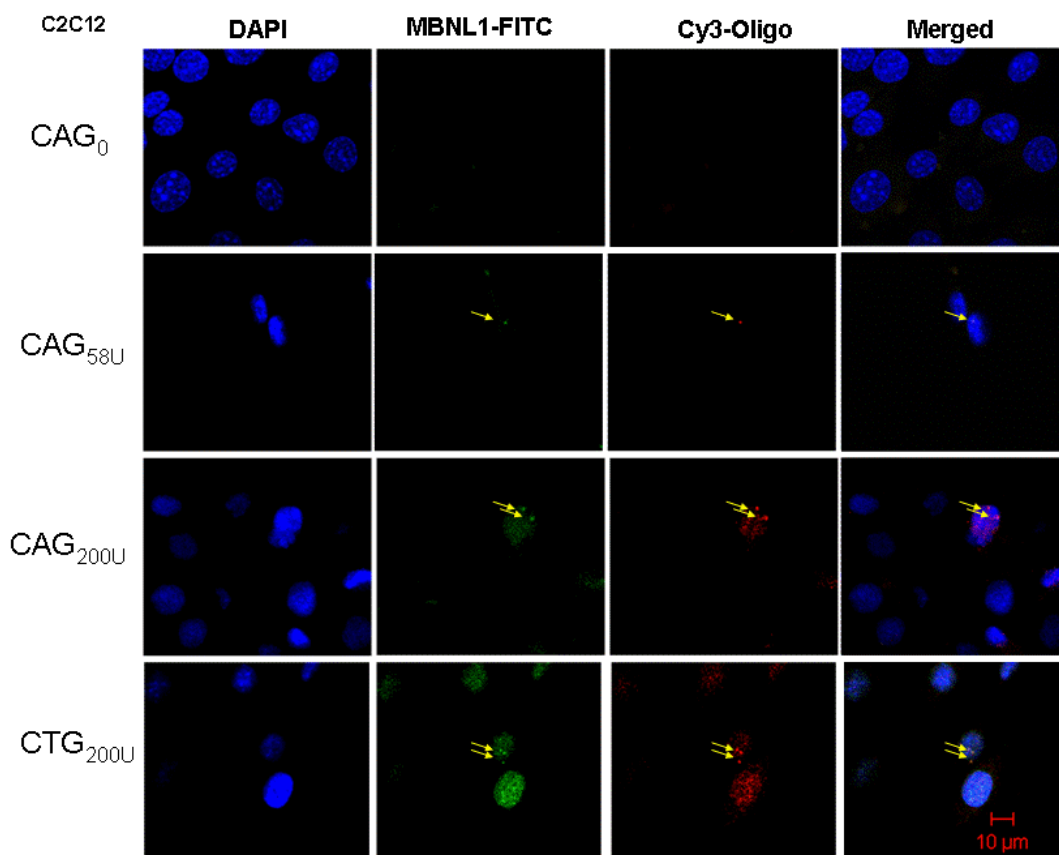


Figure 7. 轉殖質體在細胞內的表現。(A)以 Northern blot 來分析，利用 EGFP probe 來偵測帶有 C-CAG₂₀₀、U-CAG₂₀₀ 質體的細胞會分別偵測到 1.6kb 訊號。在帶有 U-CAG₅₈、C-CAG₅₈ 的細胞會偵測到 1.2kb 的訊號而 CAG₀ 的則是偵測到 1kb 的訊號。轉殖基因 RNA 表現長度都如預期，但 U-CAG₂₀₀、U-CTG₂₀₀、C-CAG₂₀₀ 的表現量有下降的情形 (B) RT-PCR 分析 (C) Western blot 分析，利用 Anti-polyQ 和 Anti-EGFP 的抗體來偵測帶有 C-CAG₂₀₀、C-CAG₅₈ 質體的 Neuro-2a cell 會分別偵測到 60kD 或 37kD 的訊號。利用 Anti-EGFP 的抗體，在帶有 N3、U-CAG₅₈、U-CAG₂₀₀ 和 U-CTG₂₀₀ 的 Neuro-2a cell 會偵測到 29kD 的訊號。利用 Anti-actin 偵測內源性控制組 actin 會有 43kD 的訊號。轉殖基因蛋白質表現如預期，但 U-CAG₂₀₀、U-CTG₂₀₀ 和 C-CAG₂₀₀ 的蛋白質表現量也有下降的情形。

Fig 8 A



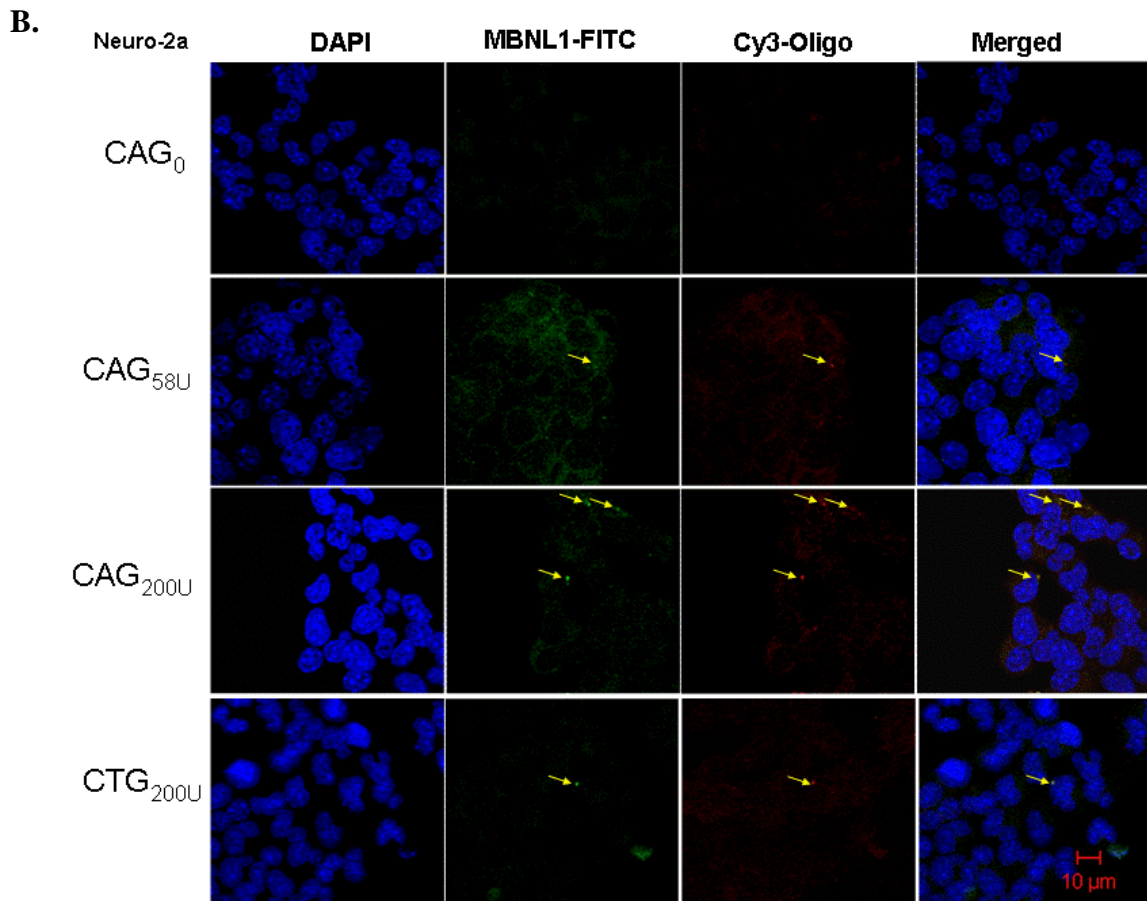
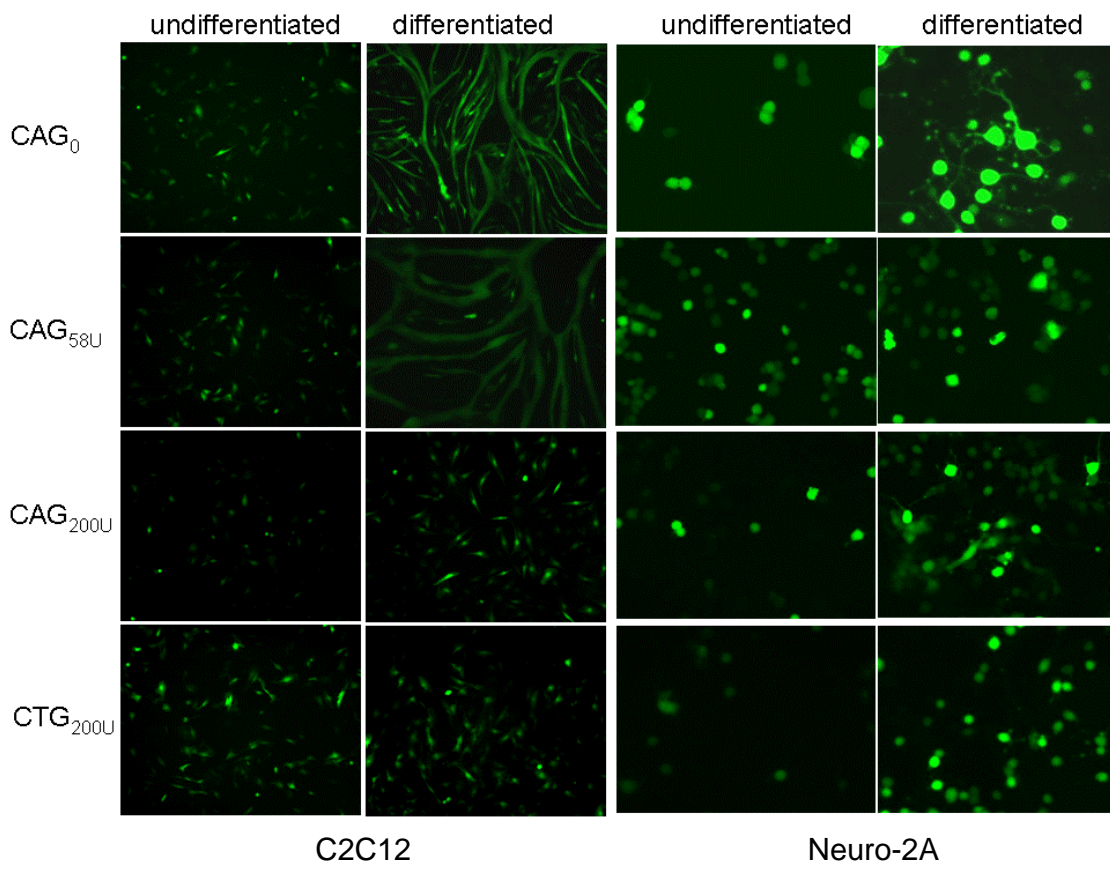


Figure 8. RNA foci 的形成及與 MBNL 蛋白質 co-localization 情形。(A) C2C12 細胞。以 Cy3-(CTG)10 或 Cy3-(CAG)10 為探針進行螢光原位雜交分析。紅色訊號為探針標定螢光，藍色為細胞核。在帶有 U-CAG₅₈、U-CAG₂₀₀ 和 U-CTG₂₀₀ 的細胞內有偵測到核內產生 RNA foci 的堆積情形。再以 MBNL 免疫螢光染色(FITC-綠色)，可看到 RNA foci 與 MBNL 蛋白質 co-localization。(B) Neuro-2a 細胞。少數 RNA foci 形成與 MBNL 蛋白質聚集，但主要出現在細胞核外。

Figure 9. 重複序列對細胞分化之抑制。(A) 帶有不同長度重複序列之 C2C12 以及 Neuro-2a 細胞在誘導分化前及分化後第 7 天所觀察之細胞形態。帶 200 次重複之 CAG 和 CTG 序列都會抑制 C2C12 細胞形成 myotube，58 次重複之 CAG 則無明顯抑制。而在 Neuro-2a 細胞雖帶有 200 次重複之 CAG 和 CTG 序列，仍可部份分化長出軸突和樹突之構造。(B) 上排: Myosin heavy chain (MHC) 之 Western blotting。下排: 肌肉細胞分化指標基因之 RT-PCR 分析。含有 200 次重複序列之 C2C12 細胞在誘導分化後，其基因表現仍停留在分化前的 pattern。CAG₀ 細胞則表現出分化後特有的基因表現形式。

Fig 9A



B.

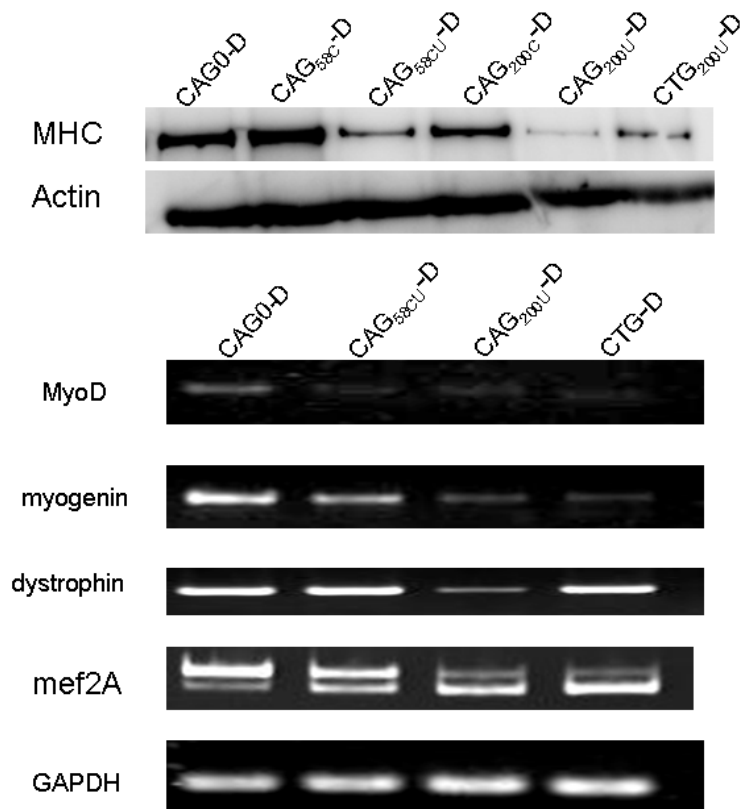


Fig 10

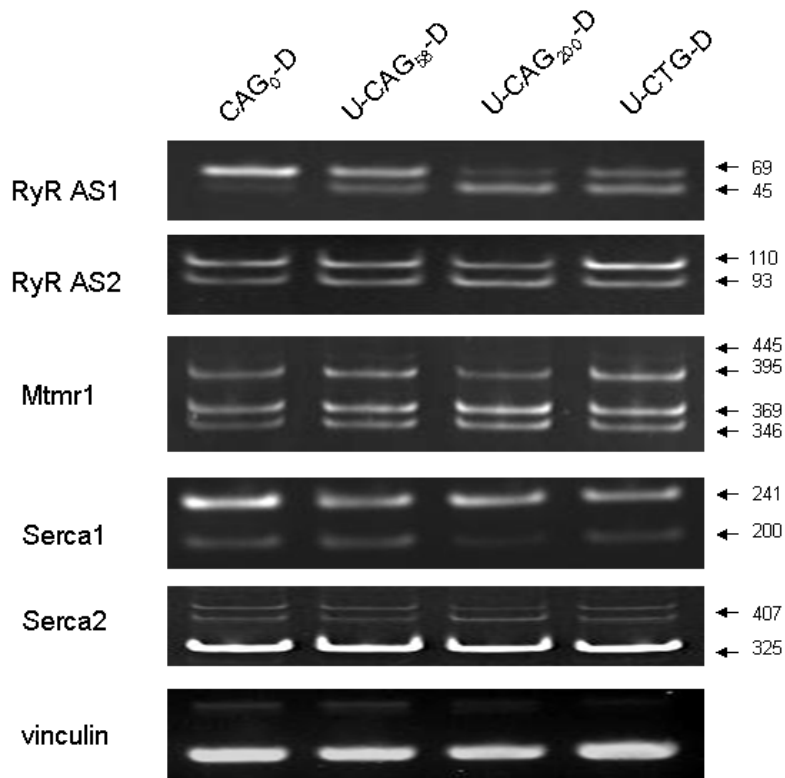


Figure 10. C2C12 細胞誘導分化後的部份基因剪輯(splicing)形式。RyR AS1 及 vinculin 基因在 U-CAG₂₀₀ 及 U-CTG₂₀₀ 細胞有明顯的異常 splicing。其餘 RyR AS2, Mtnr1, Serca1 和 Serca2 則無明顯異常。

