

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

非轉譯區 CAG 三聯核酸重複序列擴增所引發的致病機制之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-045-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

計畫主持人：潘惠錦

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告

非轉譯區 CAG 三聯核酸重複序列擴增所引發的致病機制之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2320-B-040-045

執行期間： 94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

計畫主持人：潘惠錦

共同主持人：

計畫參與人員： 蕭光明、陳倫魁、何蕙如、張庭皓

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學 生物醫學系

中 華 民 國 95 年 10 月 25 日

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

非轉譯區 CAG 三聯核酸重複序列擴增所引發的致病機制之研究

Study on the pathogenic mechanisms triggered by untranslated CAG repeat expansion

計劃編號：NSC 94-2320-B-040-045

執行期限：94 年 8 月 1 日至 95 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、何蕙如、張庭皓

一、中文摘要

三聯核酸重複序列擴增突變會造成許多人類退化性神經肌肉遺傳疾病。包括重複序列位於非轉譯區(UTR)或插入子內的易脆 X 染色體症候群(FRAX)、強直型肌肉萎縮症(DM)、及 Friedreich 氏運動失調症(FRDA)，主要由 CGG、CTG 或 GAA 等序列擴增所引起。另外由 CAG 重複序列於轉譯區擴增所引起的，包括亨丁頓氏舞蹈症(HD)、延髓肌萎縮症(SBMA)、及小腦脊髓運動失調症候群(SCA)等。目前對於這些疾病發生之分子機制並不完全清楚。為研究此類疾病之致病機制並發展疾病模式系統，之前我們利用基因轉殖技術建立了 CAG 擴增小鼠模式。我們將不同長度之 CAG 三聯核酸重複序列接在綠螢光蛋白基因的 3'UTR，並以 GSG promoter 來驅動轉殖基因在小鼠肌肉專一性表達。我們發現含 CAG₂₀₀ 之小鼠其肌肉型態、分化及生理功能異常，且生殖能力也下降；顯示 CAG expansion 會造成 RNA gain-of-function 的效應。在此計畫中，我們利用已建立之小鼠模式進一步探討造成 CAG₂₀₀ 小鼠表型的原因。首先我們利用螢光原位雜交(FISH)技術，檢測到 CAG₅₈ 及 CAG₂₀₀ 不論位在轉譯或非轉譯區內，皆能在培養細胞內形成 RNA foci；也會在 CAG₂₀₀ 小鼠肌肉細胞內形成 RNA foci。其次，我們分析了精子粒腺體功能，以解釋 CAG₂₀₀ 小鼠生殖能力下降的原因。另外，我們利用基因晶片微陣列分析、以及蛋白質 2-D 膠體電泳及生物分子質譜技術來尋找受到 CAG 擴增突變影響而產生差異表現之基因及相關蛋白質。經由 RT-PCR 及 real-time PCR 鑑定結果我們找到 15 個 up-regulated 及 6 個 down-regulated 的基因，它們大多與細胞分化、能量代謝有關。在睪丸組織中則找到 1 個 up-regulated 及 7 個 down-regulated 的基因，主要與成精作用有關。

關鍵詞：CAG 重複序列、RNA 致病機制、RNA 聚集、微陣列分析、蛋白質二維膠體電泳

ABSTRACT

A number of human neuromuscular disorders have been found to be caused by expansion of unstable trinucleotide repeats. Disorders caused by expansions, mainly CGG, CTG or GAA, in the untranslated regions or introns include fragile X syndrome (FRAX), myotonic dystrophy type 1 (DM1), and Friedreich's ataxia (FRDA), etc. Repeats located in the coding region of the affected gene, mainly CAG expansions, are the basis for disorders like Huntington's disease (HD), spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), and spinocerebellar ataxias (SCAs). So far the molecular mechanisms underlining these disorders have not been understood completely. In order to investigate the pathogenic mechanism of the disorders, we previously established a transgenic mouse model in which expression of enhanced green fluorescence protein (EGFP) gene fused with different lengths of CAG repeat in its 3'-UTR was directed to the muscle by a mouse GSG promoter. Mice expressing the long tract of CAG repeat (CAG₂₀₀) were found to exhibit altered muscle morphology, differentiation and physiology, as well as reduced fertility. This suggests that CAG expansion may result in an RNA gain-of-function effect. In this study, we further explore the molecular basis for the phenotypes observed in CAG₂₀₀ transgenic mice, and search for the possible downstream targets that interact with or are affected by the expanded CAG RNA. Using fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, we found that RNA foci were formed in the cultured cells transfected with CAG₅₈ and CAG₂₀₀ constructs either in coding or non-coding region, as well as in muscle cells of the CAG₂₀₀ mice. We also analyzed sperm mitochondrial function, by staining with rhodamine123 (Rh123) and propidium iodide (PI) followed by flow cytometric sorting. Most sperm cells from CAG₂₀₀ males were gated with low Rh123 fluorescence, suggesting that they had low mitochondrial activity and thus poorer sperm motility. This explained the reduced fertility in CAG₂₀₀ mice. Furthermore, to search for the differentially expressed genes and related proteins in muscle and testis of the CAG₂₀₀ mice, we perform cDNA microarray assays, and protein 2-D gel electrophoresis followed by MALDI-TOF analysis. Results from RT-PCR and real-time PCR revealed 15 up-regulated and 6 down-regulated genes. Most of these genes and proteins are related to differentiation and energy metabolism. We also found 1 up-regulated and 7 down-regulated proteins in testis, and these proteins are mainly related to spermatogenesis.

KEYWORDS: CAG repeats, RNA pathogenesis, RNA foci, microarray, protein 2-D gel electrophoresis

二、緣由與目的

在研究人類遺傳性退化型神經肌肉疾病中發現，三聯核苷酸重複序列擴增突變可能是造成相關臨床症狀的主因之一。依重複序列擴增突變的位置主要區分為兩類。第一類位於轉譯區，主要由(CAG)_n 核苷酸重複序列擴增突變，造成專一性的神經系統方面退化，第二類位於非轉譯區或 intron 內，由 CGG、CTG 以及 intron 內的 GAA 三聯核苷酸重複序列擴增突變，造成肌肉萎縮、運動失調、心智遲緩、神經肌肉退化等症狀。雖然這些疾病皆是由位於不同基因座內不同的重複序列擴增突變所引起，卻有一些共通的特性：(1)多為顯性、晚發型、漸進式(2)重複次數和疾病嚴重性成正相關(3)家族遺傳的期望現象(1,2)。

目前在非轉譯區 CTG 重複序列擴增突變的致病機制主要是集中在強直型肌肉萎縮症 DM 的探討上。研究證據顯示，造成 DM 疾病在多系統方面所產生的症狀其致病機轉可能包括：**(1) Loss-of-function**：DM 病人 DMPK 的 RNA 和蛋白質濃度皆比正常人低，此外，也有報告指出帶有 CTG 三聯核苷酸重複序列擴增突變的 DMPK mRNA 無法被送出核外，會在核內堆積形成 RNA foci (3)。而在 DMPK 基因的剔除動物模式發現，只有肌肉無力萎縮的情形，並無肌強直的典型症狀(4)，因此單基因的缺失並不能完整解釋 DM 的致病原因。**(2) RNA-gain-of-function**：利用基因轉殖鼠表現 CTG 三聯核苷酸重複序列擴增突變研究顯示，不論(CUG)_n tract 是否位於疾病基因(DMPK)上，皆會造成 DM 的臨床症狀(5,6)。這樣的結果顯示，CTG 三聯核苷酸重複序列擴增突變可能會導致 RNA-gain-of-function 的作用。目前已知機制除了影響 polyadenylation，過長的(CUG)_n-RNA 會在核內堆積形成 RNA Foci 並吸引 RNA-binding protein 如 muscleblind 等結合其上，造成下游基因異常的 splicing (7,8)。此外，在 FXTAS 果蠅模式中亦發現致病的 CGG 重複序列也會形成 RNA foci (9)。

多數轉譯區含(CAG)_n 重複序列的疾病，其基因 loss-of-function mutation 並不會表現出病症特徵，目前認為可能是因致病基因產物含有過長的 polyglutamine，造成 toxic protein gain-of-function。在動物模式實驗中已被證實，這些過長的 polyglutamine 會形成 nuclear inclusions，改變 protein folding homeostasis；這些 misfolding protein 被 ubiquitin target，帶至 proteosome 卻又無法被降解(degradation)，阻塞了細胞內正常的 proteosome 的功能，因而造成細胞的傷害，造成神經肌肉系統方面的退化(2,10)。目前對於轉譯區含 CAG 重複序列擴增所引起的疾病中，尚無證據顯示有 RNA foci 的形成。

(CUG)_{>20} RNA 易形成 stable RNA hairpins，使得 double-stranded RNA binding protein 可以結合上去。其他含 CAG, CUG, CGG, CCG 重複序列之 RNA 也已被證實會形成 hairpin 結構，顯示 RNA 結構與疾病造成可能有密切關係 (11)。為了更深入探討非轉譯區內擴增三聯核苷酸重複序列與神經肌肉疾病之關係，我們先前利用轉殖線蟲模式分析不同長度的 CTG 及 CAG repeat 對線蟲體壁肌肉細胞造成的影響，意外地發現位於 3'-UTR 的 CAG 擴增也會造成線蟲神經肌肉結構及功能異常，因此更進一步建立 3'-UTR CAG expansion 的轉殖基因小鼠模型。我們將不同長度的 CAG 重複序列

(CAG₀、CAG₂₃、CAG₂₀₀)接在綠螢光蛋白 EGFP 基因之 3'端非轉譯區，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。在小鼠模式中，我們證實了線蟲的發現，過長的 3'-UTR CAG repeat 不但造成小鼠肌肉形態、分化、及功能異常，在生殖系統中也影響到精子的活動力，使小鼠的生殖率大幅減低。這些觀察首次證實了 CAG expansion 會造成 RNA gain-of-function 的效應，而此效應有別於先前所知的 CTG expansion，應是由不同的途徑所造成的結果。

在此研究中，我們以已建立的模式為基礎，進一步探討造成 CAG₂₀₀ 小鼠表型的原因，找出可能受到 3'端非轉譯區 CAG 擴增 RNA 影響的下游分子，探討其作用機制以及 RNA-binding proteins 所扮演的角色。

三、結果與討論

1. 探討 3'端非轉譯區 CAG 擴增 RNA 是否會形成核內 RNA foci

在 DM 的研究中，3'端非轉譯區擴增的 CUG RNA 已被證實會形成核內堆積(RNA foci)，此 RNA foci sequester 其他 RNA-binding protein，進而影響細胞內正常的 RNA processing。我們之前的實驗結果顯示，重複序列較長的 CAG₂₀₀ 與重複序列較短的 CAG₂₃ 或完全不含重複序列的 CAG₀ 轉殖基因在小鼠細胞內的 RNA transcript 表現量差異不大，但是 EGFP 蛋白的表現量卻顯著下降。為探討 3'端非轉譯區擴增的 CAG RNA 是否也會形成核內 RNA foci，造成 nuclear retention 現象而影響正常 RNA 從核內至核外的運輸，我們取新生幼鼠做初級細胞培養，利用 Fluorescence in situ hybridization (FISH)技術，以螢光(Cy5)標定之 CTG₁₀ 作為探針，初步看到部份 CAG₂₀₀ 細胞內有 RNA foci 出現。由於小鼠模式中，含有三聯核苷酸重複序列擴增突變的 mRNA 量不是很多，且重複次數沒有病人長，故很難清楚看到 RNA foci。在此我們先利用哺乳動物的細胞(HeLa cell)作為研究系統，建構一系列以 CMV 為 promoter，在 EGFP 轉譯區及非轉譯區中含 (CAG)_n、(CTG)_n 擴增的質體，transfect 至細胞內，並改用 Qdot-605 為螢光劑來作 FISH 分析。結果發現不同重複序列長度的質體其 transfection efficiency 不同，重複次數越多對 transfection efficiency 越差，而位於轉譯區的重複序列影響似乎又比位於 3'端非轉譯區的還大(圖一)。此外，已知 CAG 在轉譯區的擴增突變會產生 PolyQ 的聚集，而我們將在轉譯區含(CAG)₅₈/(CAG)₂₀₀ 質體送入 HeLa cell 後亦看到有 EGFP-PolyQ 聚集的情形，而含 CAG 重複次數越多聚集的情形也越明顯(圖二)。利用 FISH 可看到，當作 negative control 的 pEGFP-N3 其不會形成 RNA foci，而當做 positive control 的(CTG)₂₀₀-3'UTR 則會形成 RNA foci。我們同時也發現在不同長度及位置的 CAG 重複序列擴增突變亦會形成 RNA foci，只是數量似乎較少(圖三)。利用 DNase 處理，仍有 RNA foci 的訊號，用 sense 的探針去偵測並無 RNA foci 之訊號，顯示此 foci 是專一性的 (data not shown)。實驗結果，確認不同長度及位置的 CAG 重複序列擴增突變皆能在核內形成 RNA foci。用小鼠肌肉組織切片做此實驗，也觀察到同樣的結果(圖四)。

2. 探討 CAG₂₀₀ 小鼠生殖力下降與粒腺體功能的關係

從 CAG₂₀₀ 小鼠的肌肉組織病理切片染色，及骨骼肌產生攣縮的電生理分析，暗

示 3'端非轉譯 CAG 擴增可能影響到粒腺體的功能。粒腺體是細胞製造 ATP 提供能量的中心，對細胞正常功能的維持扮演重要的角色。特別是一些對能量需求較高的細胞行為，如肌肉收縮、精子游動等，皆須有正常的粒腺體功能。我們發現 CAG₂₀₀ 公鼠的精子游動力下降，並觀察到其鞭毛 axoneme 及粒腺體結構異常。先前的文獻指出，粒腺體的膜電位(mitochondria membrane potential, MMP)與精子游動力有顯著的正相關(12)。由於螢光染劑 Rhodamine 123 (Rh123)可直接且專一性地染上有正常 MMP 的粒腺體，因此 Rh123 可當做 MMP 的功能指標。我們以 Rh123 和 PI 對含不同長度 CAG 的精子染色，再以 flow cytometry 分析其染色 pattern，發現 CAG₂₀₀ 公鼠的精子其 Rh123 螢光明顯較對照組的為低，而 CAG₂₃ 公鼠的精子其 Rh123 螢光則介於中間(圖五)，顯示精子游動力下降與粒腺體功能呈正相關。此結果也呼應了先前小鼠肌肉細胞的 phenotype 可能與粒腺體有關的推測。

3. 探討擴增的 CAG RNA 可能影響那些下游分子

為了更深入瞭解 (CTG/CAG)_n 擴增突變所影響的基因與蛋白質，我們利用小鼠生物晶片 cDNA microarray 找出(CAG)_n repeat 基因轉殖小鼠與正常小鼠之間差異表達的基因，並進一步利用二維膠體電泳進行蛋白質體學上的相關探討，期望經由分析 (CAG)_n repeat 基因轉殖小鼠與正常小鼠體內蛋白質組成以及表現量差異，藉以瞭解重複序列擴增在生物體中，對於基因表現及其下游受調控相關蛋白質之影響情形。

- (1) cDNA 微陣列序列分析: 將 CAG₂₀₀ 基因轉殖鼠的樣本以紅色的螢光染劑 Cy-5 標定，NT 非基因轉殖鼠的樣本以綠色的螢光染劑 Cy-3 標定，若受測基因在兩種不同的遺傳背景中表現量相等，則經由雜交結果所得的訊號呈黃色；若受測基因在 CAG₂₀₀ 基因轉殖鼠中表現量較高，結果呈現紅色、反之則為綠色。由圖中的結果可見，多數的訊號呈現代表無差異表現的黃色，少數代表差異基因的紅、綠色點其訊號強度都很微弱。這樣的結果表示，具表現差異的基因在表現量的差距並不大。為減少實驗的誤差，雜交實驗皆進行 2 次以上的操作測試，以確保數據的可靠性。訊號設定的閾值是以 (訊號值/背景值) 大於 2.0 以上定為 up-regulated, (訊號值/背景值) 小於 0.5 以下定為 down-regulated。經量化後的結果，符合閾值條件的訊號雖然不少，但由於這些訊號的強度(intensity)皆不高故不採信其訊號。將具有差異表現的基因依其功能性區分，可以整理成 表一。經由此結果可以看出，up-regulated 基因中主要影響的是在 Matrix/Structural Proteins 方面；down-regulated 調控的基因，則是以 Signal Transduction 與 Energy/Metabolism 部分較多。
- (2) 二維電泳分析:由於前述方法只能偵測基因在轉錄層次的差異，而無法得知基因在轉錄後 (post-transcriptional) 及轉譯層次的改變，因此，為進一步瞭解具有 CAG 重複的序列是否也會對下游基因所轉譯出來的蛋白質產生影響，我們使用二維電泳技術來快速分析蛋白質的改變 (13)。取肌肉及睪丸組織蛋白 500~600μg，進行二維膠體電泳分析，每組實驗皆重複 2~3 次，以相同的條件下進行第一維及第二維的電泳。電泳結果以 Coomassie Blue 染色顯像，經由影像掃描建檔以及軟體比

對。將比對結果標定，可得到肌肉部份在 CAG₂₀₀ 與 NT (圖六)中具有差異的蛋白點。以及睪丸部份在 CAG₂₀₀ 與 NT(圖七)中具有差異的蛋白點。將這些位置的蛋白點從膠片上挖下，使用 Trypsin 內切酶，進行 in gel digestion，以 MALDI-TOF-Q-TOF spectrometry 進行分析，與蛋白鑑定。以所得到的 MALDI-TOF-Q-TOF，經由 Mascot 線上軟體進行比對。將鑑定出的蛋白依所萃取的組織區分成肌肉組織 (表二)以及睪丸組織 (表三)。在肌肉組織鑑定出的蛋白主要可分為：(1)抗氧化傷害相關蛋白—Malate dehydrogenase、Carbonic anhydrase III (2)結構骨架相關蛋白—Myosin-binding protein H (MyBP-H)、Troponin T (3)能量代謝相關蛋白—Muscle glycogen phosphorylase、Enolase 3 (beta)、Creatine kinase、Aldolase 1、Electron transferring flavoprotein、Adenylate kinase 1。在睪丸組織鑑定出的蛋白主要可分為：(1)轉譯後修飾相關蛋白— Calcium binding 140k protein (CBP-140) (2)能量代謝相關蛋白—78kDa glucose-regulated protein、testis-specific phosphoglycerate kinase (Pgk) 以及 (3)精子生合成相關蛋白—Ube1x protein (Ubiquitin-activating enzyme E1 X)、Tumor rejection antigen gp96 (TRA1)、dnak-type molecular chaperone HSP 70.2、Aldose reductase (AR) 等。這些具有差異的蛋白，僅是二維電泳初步鑑定的結果，對於蛋白正確的作用位置與表現調控情形仍需以後續實驗進行確認。

四、成果自評

此計畫是延續之前的研究，對 CAG 重複序列基因轉殖鼠所觀察到的表型及其可能的致病分子機制做更深入的探討。由於原定三年的計畫被刪減成一年期，使原定的目標被迫精簡，但我們仍完成了原計畫中前半段三分之二的實驗。本計畫的執行除了研究生的參與外，也同時訓練了二位大學部的同學，使他們在今年度的大專生專題研究計畫申請順利通過。今年度的碩士生也從此計畫開啟了另一個相關的研究，期待後續的結果得以補足本計畫的故事，使此部份成果可以有期刊論文發表。

五、參考文獻

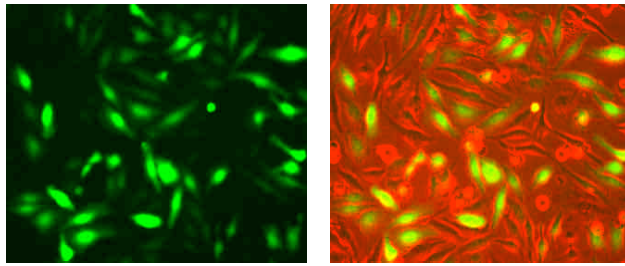
1. Ranum, L. P., and Day, J. W. (2004) Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease. *Trends Genet* 20, 506-512
2. Everett, C. M., and Wood, N. W. (2004) Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 127, 2385-2405
3. Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, 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 U S A*, **94**, 7388-93
4. 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.
5. Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J. C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., Fouquet, C., Butler-Browne, G., Delacourte, A., Junien, C., and Gourdon, G. (2001) Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet* 10, 2717-2726
 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, 1769-1773
 7. 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, 805-814
 8. Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* 19, 4439-4448
 9. 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.
 10. Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure, L.S.t., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S. *et al.* (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell*, **91**, 753-63.
 11. 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**, 5469-5482.
 12. Troiano, L., Granata, A.R.M., Cossarizza, A., Kalashnikova, G., Bianchi, R., Pini, G., Tropea, F., Carani, C. and Franceschi, C. (1998) Mitochondrial Membrane Potential and DNA Stainability in Human Sperm Cells: A Flow Cytometry Analysis with Implications for Male Infertility. *Exp. Cell Res.*, **241**, 384-393.
 13. O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, **250**, 4007-4021.

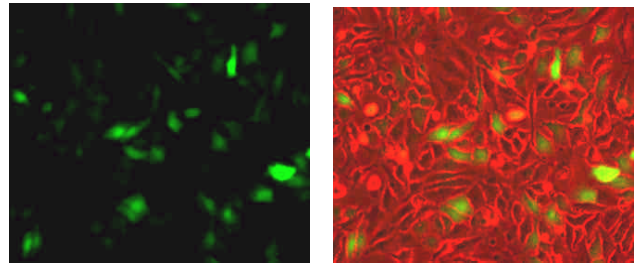
FIGURES

Fig. 1

A. EGFP-N3 (efficiency : 64 %)



CTG200-3'UTR (efficiency : 42 %)

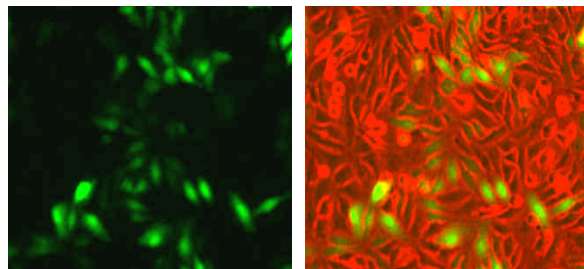


B.

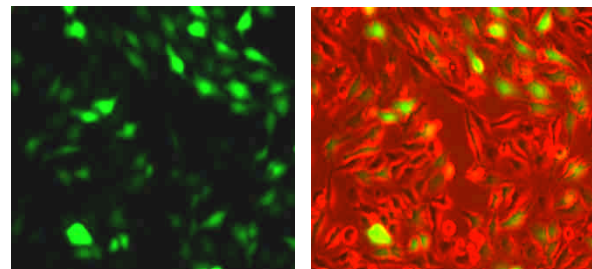
轉譯區

3'端非轉譯區

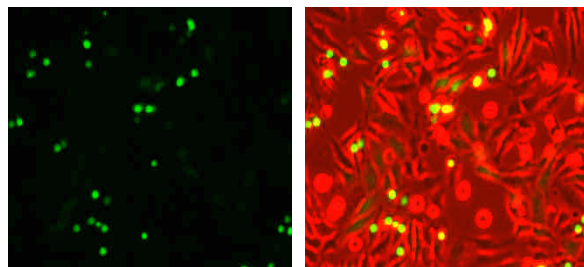
CAG58 (efficiency: 50 %)



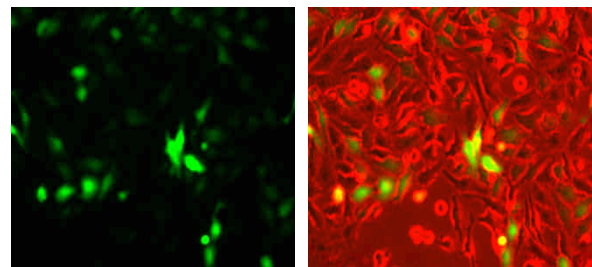
CAG58 (efficiency: 59 %)



CAG200 (efficiency: 38 %)



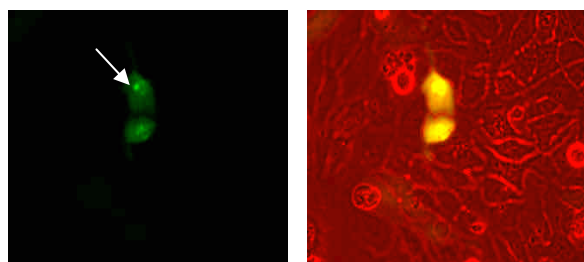
CAG200 (efficiency: 45 %)



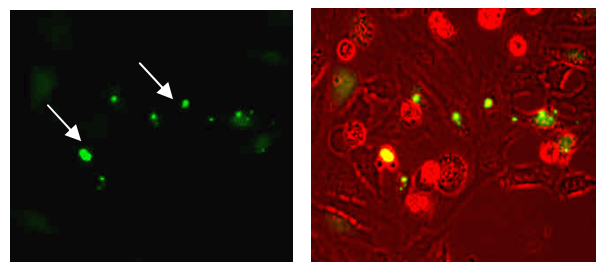
圖一、重複序列次數越多 transfection efficiency 的影響似乎越多。而比較轉譯區跟非轉譯區，重複序列在轉譯區的影響也似比在非轉譯區大。

Fig.2

CAG58

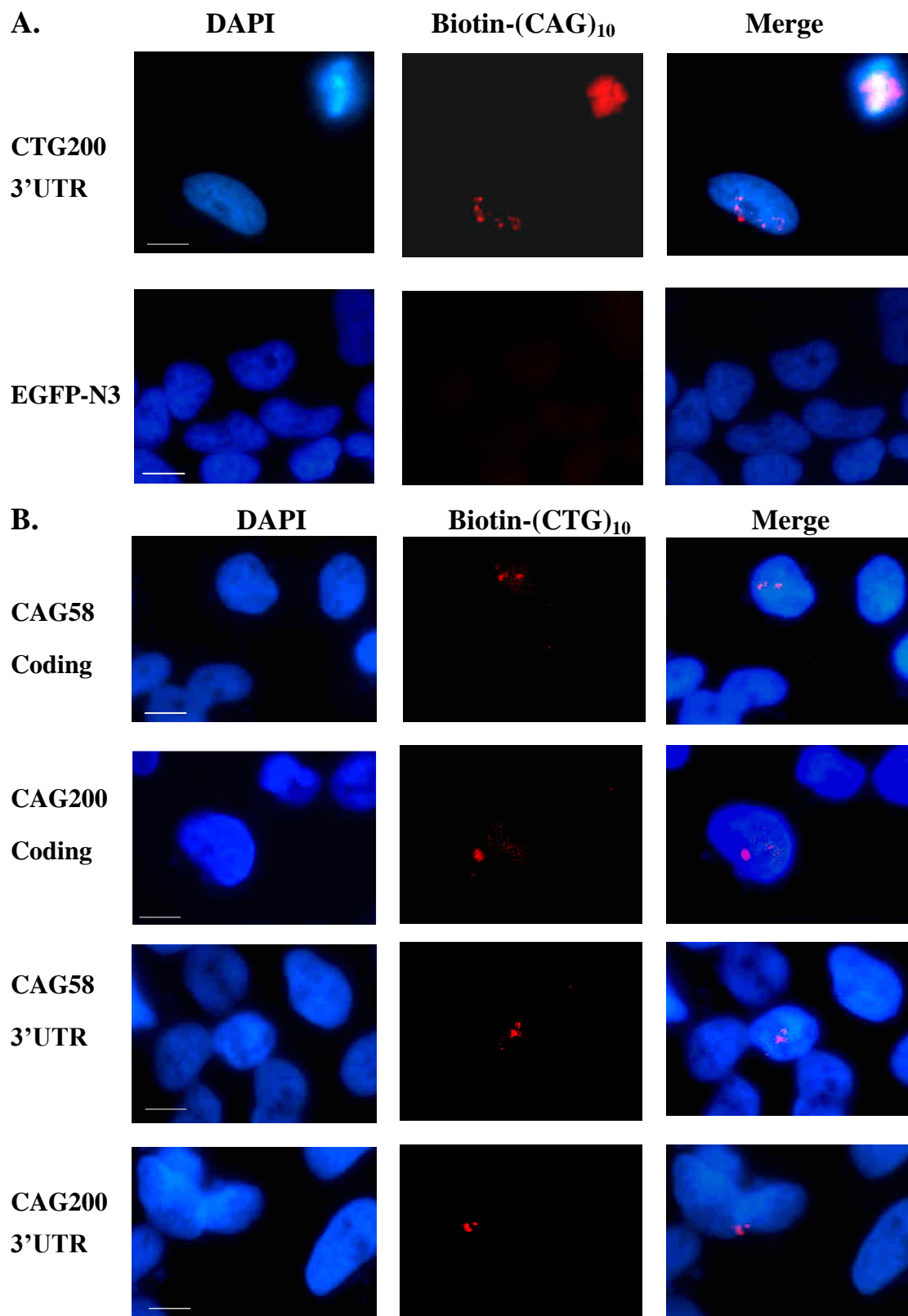


CAG200



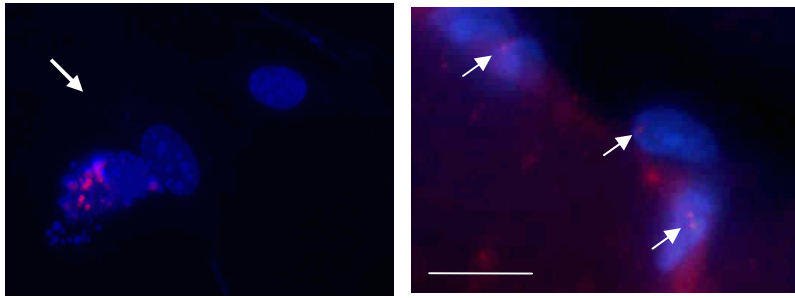
圖二、在轉譯區含(CAG)₅₈ / (CAG)₂₀₀ 擴增突變的質體質體在 HeLa cell 中產生 PolyQ 聚集的現象(箭頭處)，而(CAG)₂₀₀ 的聚集較明顯。

Fig. 3



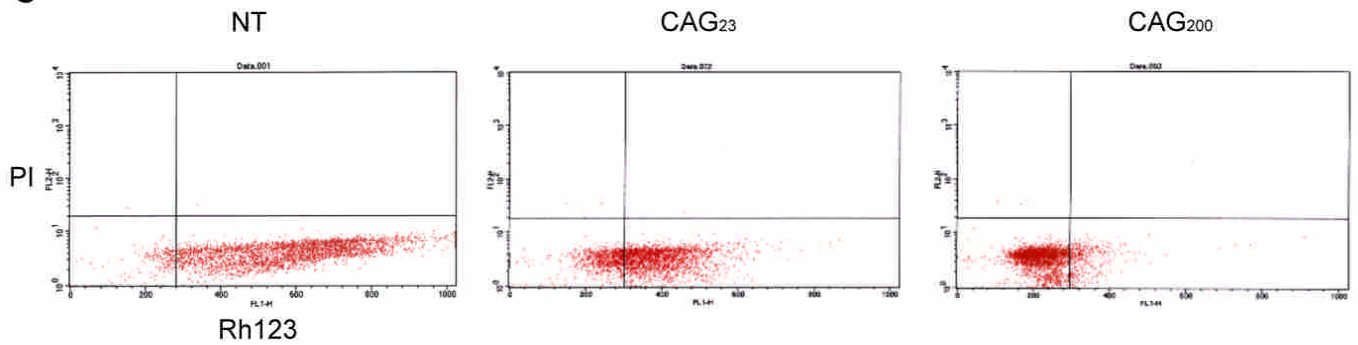
圖三、利用 Fluorescence *in situ* hybridization 來看不同長度及位置的 CAG 重複序列擴增突變形成 RNA foci 的情形。(A)對照組 (B)實驗組。所用的探針為 biotin 標定的 (CAG)₁₀、(CTG)₁₀，可以看到除了當作 Negative control 的 pEGFP-N3 外，其餘的質體皆會在核內形成 RNA foci。

Fig. 4

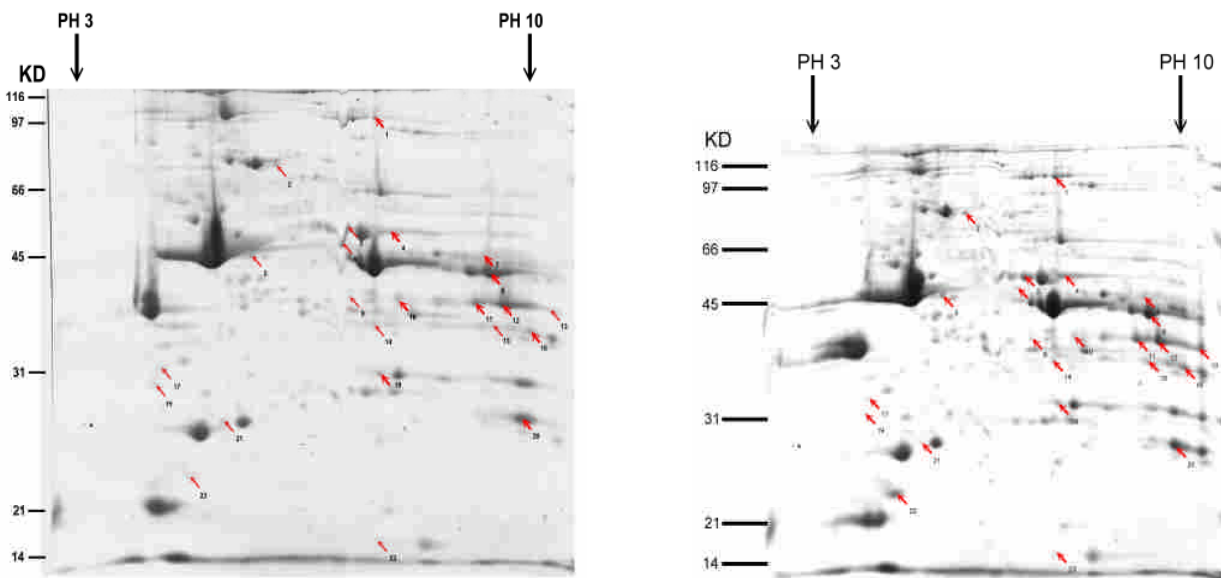


圖四、CAG200 小鼠在初代培養細胞(左)和肌肉組織切片(右)中以 FISH 所觀察到的結果，CAG 擴增突變形成之 RNA foci (箭頭所指處)。

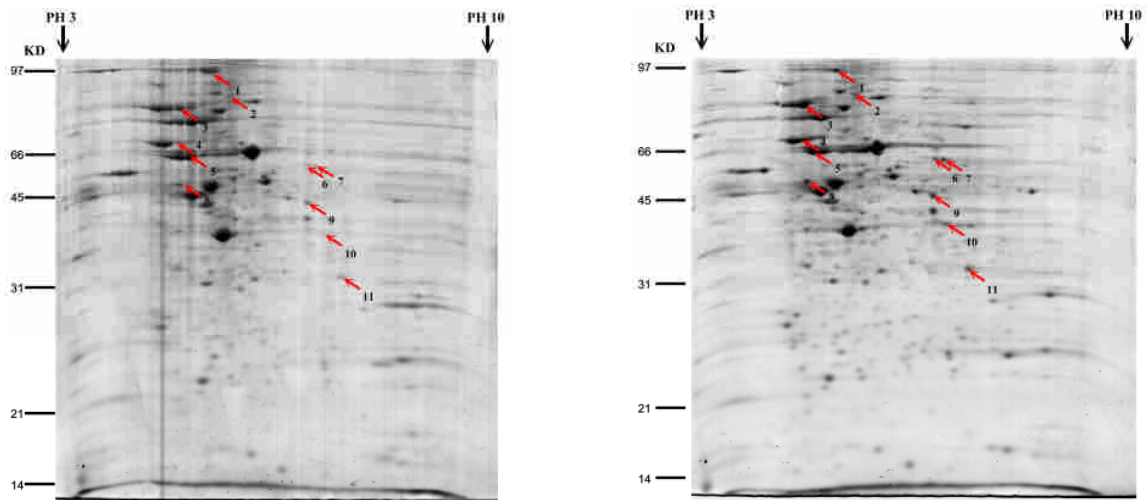
Fig.5



圖五、精子粒線體活性。精子分離出來後以 Rh123 和 PI 染色，再以流式細胞儀分析。縱軸: PI 強度，橫軸: Rh 123 強度。低 Rh123 代表低粒線體活性，而低 PI 值代表精子是活的。



圖六、二維電泳肌肉部份在 CAG₂₀₀ (左)與 NT(右)中具有差異的蛋白點



圖七、二維電泳罩丸部份在 CAG₂₀₀ (左)與 NT(右)中具有差異的蛋白點

表一、Microarray 分析結果中，依功能性分群 Up / Down regulated gene 數目情形

<i>UP</i>		<i>DOWN</i>	
Matrix/Structural Proteins	13	Matrix/Structural Proteins	2
Heat Shock/Stress	6	Heat Shock/Stress	
Signal Transduction	10	Signal Transduction	4
Transcription/Chromatin	6	Transcription/Chromatin	2
Protein Synthesis/ Translational Control	5	Protein Synthesis/Translational Control	3
Energy/Metabolism	3	Energy/Metabolism	4
Apoptosis		Apoptosis	1
cell cycle		cell cycle	1

表二、CAG₂₀₀ 與非基因轉殖鼠二維電泳在肌肉組織差異蛋白點鑑定結果

	Exp. Mr	Exp. pl	Theor. Mr	Theor. pl	Protein name	Accession No.	Variation
1	~97KDa	~7	97286.3	6.65	muscle glycogen phosphorylase	gil6755256	-3.105
2	~66KDa	~5.5	52588.38	5.66	Myosin-binding protein H (MyBP-H)	gil6093458	2.5888
3	~50KDa	~6.5	47013.90	7.08	enolase 3, beta muscle	gil54035288	2.006
4	~48KDa	~6.7	46995	6.73	enolase 3, beta muscle	gil6679651	7.5965
5	~45KDa	~5	37729.22	5.35	alpha-actin	gil387082	5.7698
6	~45KDa	~7	49477	7.23	Tu translation elongation factor, mitochondrial	gil27370092	5.8145
7	~43KDa	~8	43018	8.58	creatine kinase	gil6671762	3.2286
8	~40KDa	~8	39331	8.31	aldolase 1	gil6671539	2.5206
9	~40KDa	~6	114459	5.83	tolloid-like	gil6678363	2.1788
10	~40KDa	~7.5	36492	7.62	similar to G3PDH (phosphorylating)	gil51829015	-2.174
11	~40KDa	~8.5	35810.01	8.44	similar to G3PDH (phosphorylating)	gil62533192	3.2309
12	~40KDa	~9	38937	9.13	similar to G3PDH (phosphorylating)	gil28485300	3.2369
13	~35KDa	~9	35588	8.93	malate dehydrogenase	gil387422	-3.45
14	~35KDa	~8	35018	8.62	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	gil13097375	2.0316
15	~31KDa	~9	25959	11.01	unnamed protein product	gil63572095	-2.43
16	~30KDa	~9	20030	11.64	unnamed protein product	gil26354020	5.4894
17	~31KDa	~5	31432	9.17	orf	gil5441500	3.476
18	~30KDa	~7.5	29329	7.86	carbonic anhydrase III	gil226778	-2.039
19	~28KDa	~4	2554	4.21	T-cell receptor beta chain CDR3 region	gil60461415	4.5201
20	~26KDa	~10	25959	11.01	unnamed protein product	gil63572095	2.7449
21	~25KDa	~5.5	23102	5.7	adenylate kinase 1	gil10946936	7.0706
22	~23KDa	~5.5	30691	5.98	troponin T	gil2340064	-4.065
23	~15KDa	~5.5	17807	4.78	unnamed protein product	gil12853715	6.1887

表三、CAG₂₀₀ 與非基因轉殖鼠二維電泳在睪丸組織差異蛋白點鑑定結果

	Exp. Mr	Exp. pl	Theor. Mr	Theor. pl	Protein name	Accession No.	Variation
1	~97KDa	~4.5	72151	5.09	calcium binding 140k protein	gil1083243	-2.3538
2	~94KDa	~5.2	117734	5.43	Ube1x protein	gil35193277	-2.65046
3	~88KDa	~4.8	92418	4.74	tumor rejection antigen gp96	gil6755863	-2.5303
4	~70KDa	~4.5	72412	4.67	78 kDa glucose-regulated protein	gil1304157	2.47646
5	~66KDa	~5	69684	5.58	dnaK-type molecular chaperone HSP70.2	gil109946	-2.24416
6	~60KDa	~7					-2.0133
7	~60KDa	~5.8	62343	6.02	unnamed protein product	gil26344902	-4.60704
8	~45KDa	~4.8	57108	4.79	unnamed protein product	gil54777	-2.85451
9	~43KDa	~7	56502	7.53	Aldh2 protein	gil13529509	-2.38858
10	~38KDa	~7.5	44882	6.63	testis-specific phosphoglycerate kinase	gil200326	-3.63209
11	~31KDa	~7.6	35725	6.71	aldose reductase	gil786001	-2.18876

