

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	: 探討剔除dna-2基因在斑馬魚DM1疾病模式中的影響
------------	------------------------------

執行計畫學生：陳彥中

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-034-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：潘惠錦

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 108年03月31日

(一)摘要

三聯核苷酸重複序列與許多遺傳性疾病有關。其中 CUG 重複序列所形成的二級結構吸引 MBNL1 與之結合，影響原本 pre-mRNA alternative splicing 的功能，是造成 DM1 疾病的原因之一。過去實驗室建立一套轉殖線蟲的重複序列疾病模式，並進一步篩選出影響重複序列轉錄效益的基因，其中一個基因為解旋酶 Dna-2。先前文獻指出，重複序列進行複製、轉錄時需要特定的解旋酶參與。Dna-2 在哺乳動物上有高度保留性，在 DNA 複製、修復、重組中，Dna-2 的參與可以使停滯的複製叉(replication fork)重啟，針對 CTG 重複序列也具有解開二級結構的能力。弱化 Dna-2 後轉殖線蟲的行為與壽命有顯著回復，實驗中利用 GFP 當作報導基因，螢光亮度也有顯著下降。在細胞實驗中，弱化 DM1 病人細胞的 Dna-2，foci 數目有顯著減少。在此計畫中我以更高等的斑馬魚疾病模式，利用 CRISPR/Cas9 技術剔除 Dna-2，並得到穩定剔除基因的斑馬魚品系，再利用分析斑馬魚的行為探討剔除基因後的影響，最後我設計一套檢查剔除率的實驗，並提出未來改善的方案。

(二)背景介紹

目前研究已知三聯核苷酸重複序列擴增會造成許多人類神經肌肉(neuronmuscular)以及神經退化性(neurodegenerative)疾病[1]。三聯核苷酸重複序列所導致的疾病依發生突變的位置可以大致分為兩種:第一種是在轉譯區的擴增，造成基因的蛋白 gain-of function 的突變，導致專一性的神經退化疾病，例如亨丁頓式舞蹈症(Huntington disease, HD)即是含有不穩定之 CAG 重複序列擴增，轉譯時產生過量 polyglutamine(polyQ)使其結構產生改變[2, 3]。第二種則是在非轉譯區的突變，如肌強直型肌肉萎縮(Dystrophia Myotonica)，患有 DM 疾病的病人，在 DMPK 基因上轉錄出的 primary RNA 之 3'UTR 有 CUG 重複序列擴增[4]，形成二級結構後吸引 RNA 結合蛋白 MNBL 與之結合，使 MBNL 無法進行原本 pre-mRNA alternative splicing 的功能[5]，而造成多系統症狀，如肌強直、肌萎縮、糖尿病、心臟異常等。其中肌肉萎縮為 DM1 的病徵之一，最終可能導致行動不便、吞嚥困難、呼吸系統衰竭等，也是作為本次計畫用來觀察的指標。

重複序列在 DNA 進行複製時會有擴增的現象[6]，並進一步產生二級結構[7]過去研究指出，解旋酶具有解開 DNA 特定結構的能力，例如 WRN(Werner Syndrome Helicase)能解開重複序列所形成的 G4 結構[8, 9]。在酵母菌的研究發現，Srs2 DNA 解旋酶(RTEL1)及 Sgs1 DNA 解旋酶(WRN)都具有解開三聯核酸重複序列所形成的 hairpin 結構的能力，並且 Srs2 DNA 解旋酶能阻止重複序列繼續擴增[10, 11]。在對形成二級結構的 RNA 研究裡，DDX6 被證實可以結合在擴增序列的 RNA 上，並解開 RNA 所形成的二級結構，而使核內的 foci 減少，將 MBNL 釋放以進行正常功能[12]。總和以上文獻推論，在含有重複序列的 DNA 進行複製、轉譯等功能時需要特定的解旋酶參與。

Dna-2 (DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease)為 DNA2/NAM7

helicase family 中的一員，並在真核生物中證實具有高度保留性[13, 14]，近期文獻指出 Dna-2 同時具有解璇酶及內切酶的能力，並協同 WRN 或 BLM 執行功能[15]。在 2008 的文獻指出 Dna-2 基因具有解開 G4 結構的能力[16]。Dna-2 參與了 DNA 複製及修復，並會移除岡崎片段(Okazaki fragment)的 RNA 引子 [17]，對於維持粒線體及核內 DNA 的穩定上扮演關鍵的角色[18]。而在細胞週期中，G1 及 G2 phase 酵母菌的 Dna-2 存在於端粒(telomeres)附近，在 S phase 時會離開 telomeres 轉而協助 DNA replication，且 Dna-2 無論在 telomerase-dependent 或 telomerase-independent 端粒延長(telomere elongation)皆有參與[19]。Dna-2 在哺乳類動物中也有同源基因，過去研究指出，Dna-2 參與在複製(replication)、修復(repair)、重組(recombine)中，可以使停滯的複製叉(replication fork)重啟 [20]。

CRISPR/Cas9系統，全名clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins，為目前發現存在於大多數細菌與所有的古菌中的一種後天免疫系統，以消滅外來的質體或者噬菌體，並在自身基因組中留下外來基因片段作為「記憶」[21, 22]。CRISPR 分為三種類型：第一型是透過 Cascade:crRNA複合體去辨識互補的DNA，再經由Cas3核酸酶進行DNA降解。

而第三型與第一型較為類似，一個包含Csm或Cmr蛋白與Cas6蛋白的複合體與 pre-crRNA結合並且加工處理pre-crRNA形成crRNA，透過這樣複雜的複合體來辨識與降解互補的DNA序列。較特別的為第二型，僅透過 Cas9 蛋白結合由 crRNA tracrRNA 形成的 pre-crRNA 就可以讓 RNase III 加工形成成熟的 crRNA，使得 Cas9/ tracrRNA:crRNA 複合體可以去辨識與切割互補的 DNA。

因為第二型無須形成複雜的蛋白複合體，因此研究學者嘗試將 crRNA 與 tracrRNA 相接形成嵌合體(single chimeric RNA or guide RNA)並且成功保留其 DNA辨識與切割的活性，經過改良後即可有效在斑馬魚胚胎中進行基因標靶剔除[23]。第二型CRISPR/Cas9的應用主要透過一個來自於化膿性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)的Cas9蛋白與一個 gRNA 形成一個複合體，該複合體會與互補的 DNA 進行辨識。辨識 DNA 序列最主要的是透過 gRNA 前端(5' 端) 的20 nt長度的序列，稱之為 Protospacer。緊接在後的三個核苷酸序列 (NGG)則稱之為 Protospacer adjacent motif (PAM)，主要是讓 Cas9 辨識並且切割DNA，造成DNA序列的破壞進而剔除基因。

實驗室先前利用轉殖線蟲建立一個三聯核苷酸重複序列的疾病模式，除了驗證帶有重複序列對線蟲造成的影響，並進一步在線蟲 RNAi library 搜尋

helicase, 共找到 34 個解旋酶, 其中有 9 個 DNA 解旋酶以及 25 個 RNA 解旋酶。針對這 34 個解旋酶進行測試, 找出參與調節擴增 CTG 重複序列轉錄效率的基因, 篩選出候選基因 F43G6.1, 在線蟲其對應的基因為 *dna-2* (DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease 2), 在對因帶有 CUG 重複序列而壽命減少、肌肉組織異常以及爬行速率下降的線蟲中, 進行 *dna-2* 的弱化(knock-down)後, 以上狀況有回復的現象。

過去實驗室所使用的線蟲模式, 都必須藉由持續的弱化來進行實驗的過程, 有鑑於 Transient 的效果與不穩定, 在本計畫中我利用 CRISPR/Cas9 的系統在轉殖魚上做 *dna-2* 的剔除(knock-out), 建立了穩定剔除基因的斑馬魚品系, 再藉由分析幼魚的行為模式來探討剔除基因後的影響。此外, 我設計了一對引子未來用於 T7E1 assay 上來檢查剔除的成功率, 也可以藉由基因編輯區域的 DNA 定序來確認實際上 CRISPR/Cas9 系統運行的效果。

(三) 實驗材料方法

一、CRISPR/Cas9 基因剔除系統

1. CRISPR/Cas9 guide RNA design

分別在Dna-2的exon1、exon2設計共三段sgRNA, 分別是在exon1的並在 Sense guide oligo 與 Antisense guide oligo 各取 1 μ l, 利用 PCR machine 進行 annealing (37°C 30 分, 95°C 5 分, 之後 1 分下降 5°C, 下降至 5°C)。

2. 製備含有CRISPR/Cas9蛋白與gRNA的質體

實驗室先前在Addgene購買pDestTol2CG2-U6_gRNA載體、pME-Cas9質體, 並選用p5E-zmylz、p3E-poly A進行LR reaction成pDestTol2CG2-U6-Cas9-zmylz-poly A質體。我將利用限制酶BseRI將pDestTol2CG2-U6-Cas9-zmylz-poly A質體處理成linear form, 與annealing產物ligation 4°C overnight。取5 μ l ligation產物與50 μ l勝任細胞Transform, 養菌後運用colony PCR檢查, 萃取質體後以酵素切做雙重確認。

3. Microinjection into Zebrafish Zygote

將製備好的質體與Tol2 mRNA以1:1的比例注入2~4個細胞時期的斑馬魚胚胎, 每次的量為25pg/2.3nl。[24]

4. T7 Endonuclease I Assay

利用 T7 endonuclease I assay (New England BioLabs), 來進行突變基因體的檢測, PCR 放大出帶有突變位點(如CRISPR/Cas9的target site)DNA片段, 將突變DNA 與控制組DNA混合, 進行加熱denature、annealing複性處理後, 加入T7E1酶, 37°C反應15 min後, 跑2%的DNA Agarose gel電泳檢測分析酶切結果。

二、行為分析

將生長第7天的斑馬魚放入96孔盤中, 並且每孔給予0.2ml egg water後利用Ethovision 分析斑馬魚之活動能力, 測試程序設定: 為時 3 分鐘、每 30 秒 tapping 一次、振幅為 8。將分析測試後的數據, 例如:泳動距離、游泳速率和游泳範圍來探討斑馬魚的游泳動作是否有無異常。

(四) 結果與討論

一、建構帶有 *dna2* gRNA 序列的三種質體

首先，我在 <https://benchling.com/editor> 上設計三段 sgRNA，再將這三段序列分別接上載體 pDestTol2CG2-U6-Cas9-zmylz-poly A[25, 26]。另外，我已事先將注射入斑馬魚胚胎測試其功能，可以觀察到心臟螢光，確定載體的效用。完成選殖的質體分別打入斑馬魚的胚胎，並在 48 小時利用心臟螢光作為篩選的標記，確定質體的效用。

二、在 CUG 疾病模式斑馬魚上建立穩定的 *dna-2* 基因剔除品系

將製備好的三種質體與 Tol2 mRNA 以 1:1 的比例均勻混和後，注入 2~4 個細胞時期的斑馬魚胚胎(*mylz2:EGFP-CUG92* x WT)，每次的量為 25pg/2.3nl。在 48 小時利用倒立螢光顯微鏡觀察斑馬魚胚胎，挑出帶有心臟螢光的個體。

三、行為分析

將生長第 7 天的斑馬魚放入 96 孔盤中，分為 WT、注射質體的 WT(WT *dna2*)、*mylz2:EGFP-CUG92*(31F5)、注射質體的 *mylz2:EGFP-CUG92*(31F5 *dna2*) 並且每孔給予 0.2ml egg water 後利用 Ethovision 分析斑馬魚之活動能力，以泳動距離、游泳速率和游泳範圍三種指標來探討斑馬魚的游泳動作。

四、設計用於 T7E1 assay 中使用之引子

我利用網站 <https://benchling.com/editor>，在原先斑馬魚 *dna2* 基因上三個 gRNA 作用位點的前後設計一組引子，利用 PCR 反應放大突變位點的 DNA 來進行 T7E1 assay 和檢查突變位點的序列使用。

sgRNA序列 From: https://benchling.com/editor	On target/Off target
zmylz-Dna2-gRNA 1 F GATACTCACAGATGATCGGCGT	50/78
zmylz-Dna2-gRNA 1 R GCCGATCATCTGTGAGTATCGA	
zmylz-Dna2-gRNA 2 F GTTTAATCTTAGATGGTCAGGT	56/82
zmylz-Dna2-gRNA 2 R CTGACCATCTAAGATTAACGA	
zmylz-Dna2-gRNA 3 F GTCGTGTCCTTACCTTTGAGGT	69/92
zmylz-Dna2-gRNA 3R CTCAAAGGTAAGGACACGACGA	

Fig.1 在<https://benchling.com/editor>上設計sgRNA位點。輸入基因名稱和點選欲設計之外顯子區域，得到候選序列及位點分數(On target/Off target)，並選用三段分數最高者當作欲運用的序列。

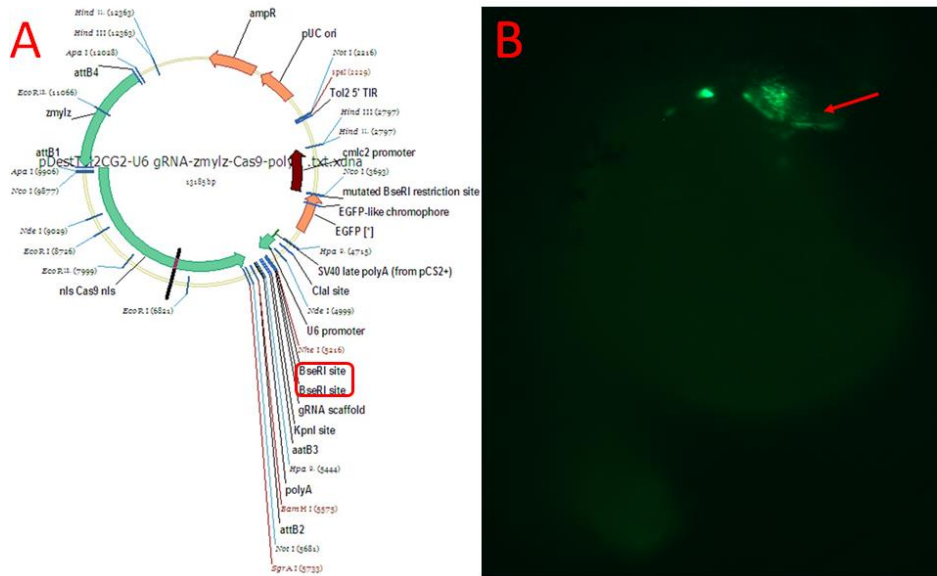
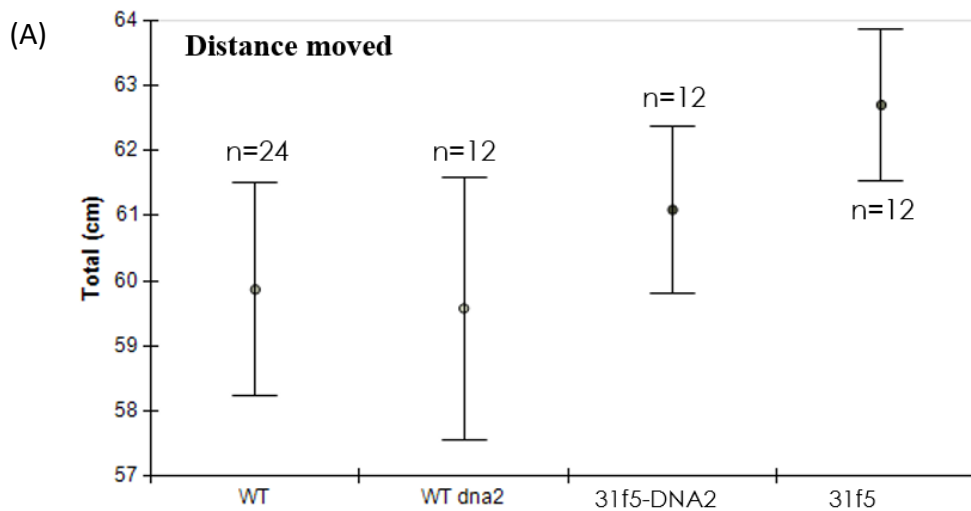
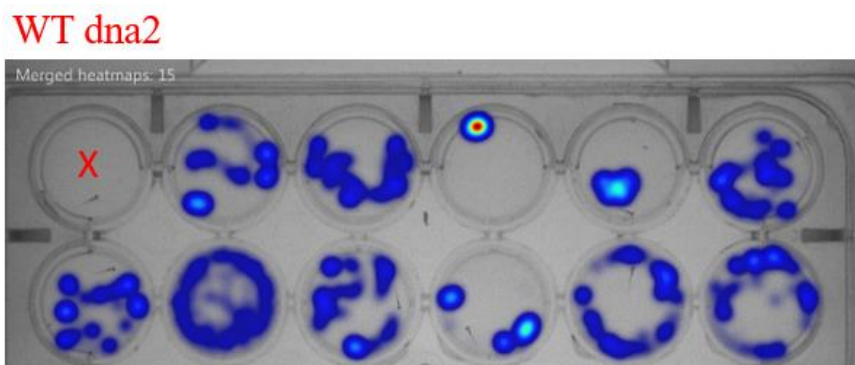
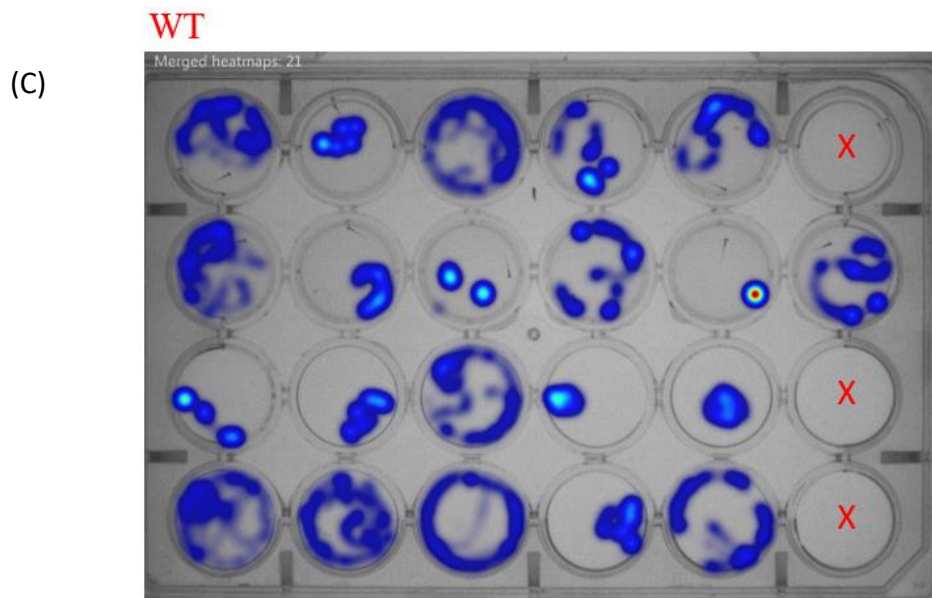
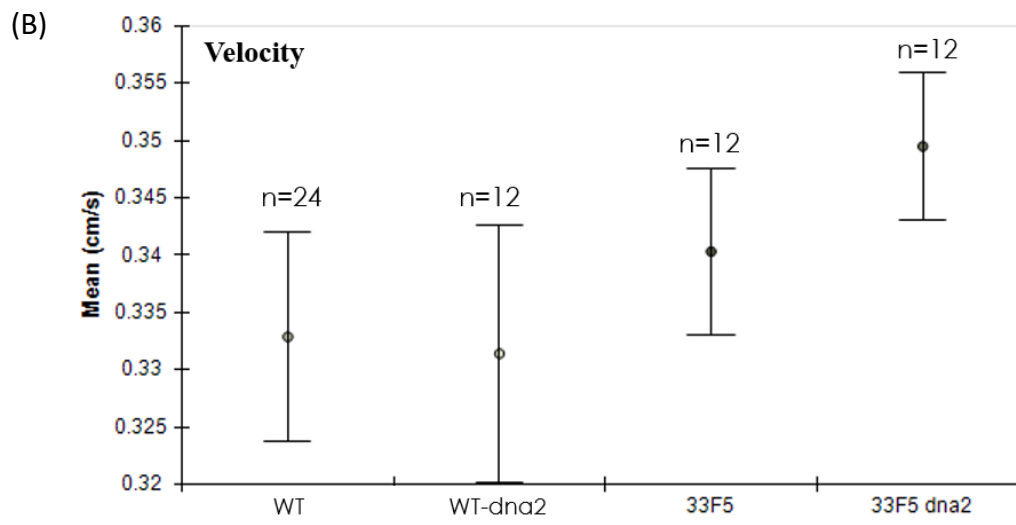


Fig.2A.構築好的pDestTol2CG2-U6-Cas9-zmylz-poly A質體圖，並選用限制酶位點BseRI將分別將sgRNA接上。B.我將質體pDestTol2CG2-U6-Cas9-zmylz-poly A以Microinjection打入斑馬魚胚胎，48小時可觀察到心臟有螢光。

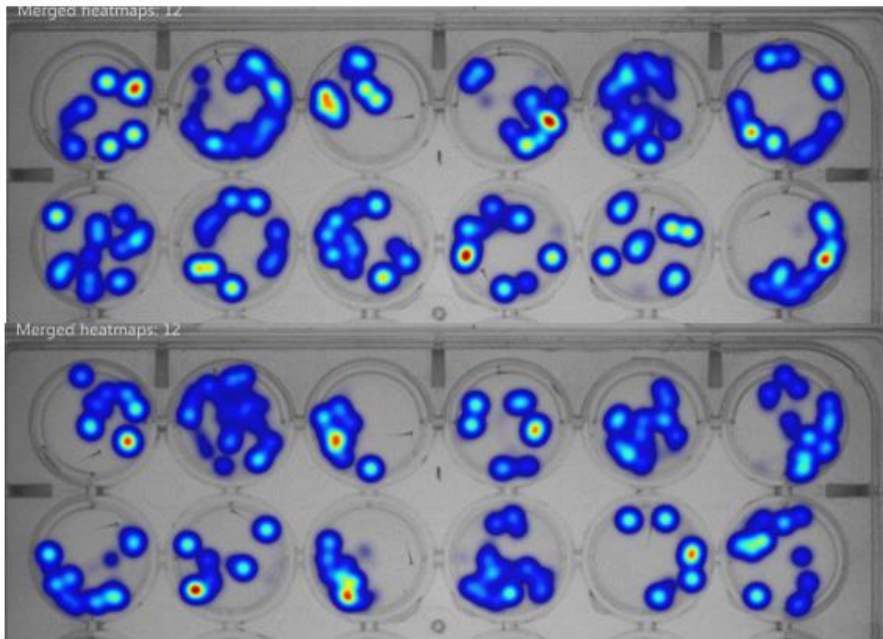


Fig.3 構築好的三個質體分別注射入WT斑馬魚胚胎，48小時後可分別觀察到心臟螢光，確定質體效用。





31F5



31F5 dna2

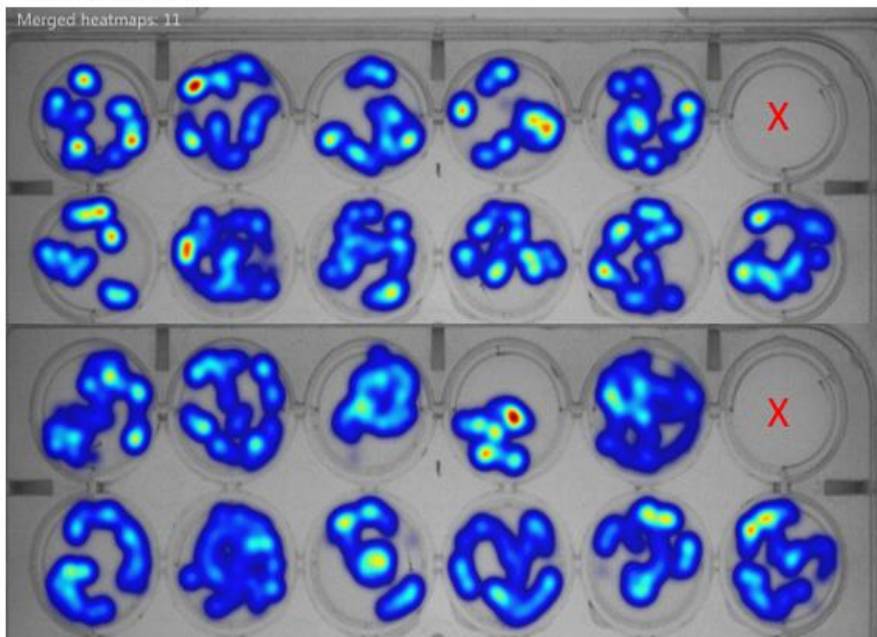


Fig.4 以Ethovision分析注射後七天斑馬魚(A)泳動距離(B)泳動速率(C)游泳範圍之統計結果，分為WT、注射質體的WT(WT dna2)、*mylz2:EGFP-CUG92*(31F5)、注射質體的*mylz2:EGFP-CUG92*(31F5 dna2)四組。測試程序設定：為時 3 分鐘、每 30 秒 tapping 一次、振幅為 8。

F: 5'- CGGGAATCTGTTTCACTGCAC TM:59.8
R: 5'- GTTGAAGTGTCCCTGTCCCGG TM:61.2

Product size:460bp

Fig.5 設計用於T7E1 assay核定序用之引子序列、TM值和預計產物長度。

在這個計劃中，我設計了三種不同的gRNA序列並且分別構築成了質體(Fig.1、2)，利用心臟螢光作為篩選標記我可以快速的分辨質體是否有作用以及成功注射的個體(Fig.3)。確定質體效用後，我將質體注射入先前實驗室已經建立的疾病斑馬魚的胚胎中，在48小時利用倒立螢光顯微鏡挑出帶有心臟螢光的23個斑馬魚胚胎(F0)，這23個胚胎便是成功的在疾病斑馬魚中剔除了*dna2*基因，並且擁有傳代性。在注射七天後我利用Ethovision分析斑馬魚的活動能力(Fig.4)，但是無論在泳動距離、泳動速率，或是游泳範圍，皆無法看到剔除了*dna2*基因後有顯著的回復，我推測是因為CRISPR/Cas9系統在每個個體的作用狀況不一致，過去文獻指出CRISPR/Cas9系統高效率的基因編輯，同時也導致高機率的脫靶效應[27]，目前在個體之間基因編輯和產生副作用的實際情況無法評估，待F0的胚胎發育至成魚後，從尾鰭收集DNA再利用T7E1 assay和目標區域的DNA定序便可判斷基因編輯的成功性。此外，若在原先設計的CRISPR/Cas9系統的基礎上，導入自我限制型的Cas9系統[28]，可以有效減少原先系統所帶來脫靶效應，也使得個體之間的情況更為一致，未來在持續累積樣本數的情況下，可望得到理想的結果。

(七)參考文獻

1. Budworth, H. and C.T. McMurray, *A brief history of triplet repeat diseases*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1010**: p. 3-17.
2. *A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group*. *Cell*, 1993. **72**(6): p. 971-83.
3. Rubinsztein, D.C., et al., *Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats*. *Am J Hum Genet*, 1996. **59**(1): p. 16-22.
4. Orengo, J.P., et al., *Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(7): p. 2646-51.
5. Konieczny, P., et al., *Myotonic dystrophy: candidate small molecule therapeutics*. *Drug Discov Today*, 2017. **22**(11): p. 1740-1748.
6. Pelletier, R., et al., *Replication and expansion of trinucleotide repeats in yeast*.

- Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1349-57.
7. Gacy, A.M., et al., *Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro*. Cell, 1995. **81**(4): p. 533-40.
 8. Ketkar, A., et al., *Residues in the RecQ C-terminal Domain of the Human Werner Syndrome Helicase Are Involved in Unwinding G-quadruplex DNA*. J Biol Chem, 2017. **292**(8): p. 3154-3163.
 9. Kamath-Loeb, A.S., et al., *Interactions between the Werner syndrome helicase and DNA polymerase delta specifically facilitate copying of tetraplex and hairpin structures of the d(CGG)_n trinucleotide repeat sequence*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16439-46.
 10. Bhattacharyya, S. and R.S. Lahue, *Saccharomyces cerevisiae Srs2 DNA helicase selectively blocks expansions of trinucleotide repeats*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7324-30.
 11. Bennett, R.J., J.A. Sharp, and J.C. Wang, *Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9644-50.
 12. Nonhoff, U., et al., *Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(4): p. 1385-96.
 13. Liu, Q., W. Choe, and J.L. Campbell, *Identification of the Xenopus laevis homolog of Saccharomyces cerevisiae DNA2 and its role in DNA replication*. J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 1615-24.
 14. Eki, T., et al., *Assignment of the closest human homologue (DNA2L:KIAA0083) of the yeast Dna2 helicase gene to chromosome band 10q21.3-q22.1*. Genomics, 1996. **37**(3): p. 408-10.
 15. Pinto, C., et al., *Human DNA2 possesses a cryptic DNA unwinding activity that functionally integrates with BLM or WRN helicases*. Elife, 2016. **5**.
 16. Masuda-Sasa, T., et al., *Processing of G4 DNA by Dna2 helicase/nuclease and replication protein A (RPA) provides insights into the mechanism of Dna2/RPA substrate recognition*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24359-73.
 17. Bae, S.H. and Y.S. Seo, *Characterization of the enzymatic properties of the yeast dna2 Helicase/endonuclease suggests a new model for Okazaki fragment processing*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 38022-31.
 18. Budd, M.E., et al., *Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase delta*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(7): p. 2490-500.
 19. Tomita, K., et al., *Fission yeast Dna2 is required for generation of the telomeric single-strand overhang*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9557-67.

20. Thangavel, S., et al., *DNA2 drives processing and restart of reversed replication forks in human cells*. J Cell Biol, 2015. **208**(5): p. 545-62.
21. Barrangou, R., et al., *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes*. Science, 2007. **315**(5819): p. 1709-12.
22. Marraffini, L.A. and E.J. Sontheimer, *CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(3): p. 181-90.
23. Jobst-Schwan, T., et al., *Acute multi-sgRNA knockdown of KEOPS complex genes reproduces the microcephaly phenotype of the stable knockout zebrafish model*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0191503.
24. Hwang, W.Y., et al., *Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 227-9.
25. Doench, J.G., et al., *Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(2): p. 184-191.
26. Ablain, J., et al., *A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish*. Dev Cell, 2015. **32**(6): p. 756-64.
27. Xiao-Hui Zhang, et al., *Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering*. Molecular Therapy—Nucleic Acids (2015) 4, e264;
28. Chih-Che Shen, et al., *Synthetic switch to minimize CRISPR off-target effects by self-restricting Cas9 transcription and translation*. Nucleic Acids Research, 2018 1