

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

利用基因轉殖線蟲研究肌強直肌肉萎縮症之致病機制(2/3)

Study of pathogenic mechanism of myotonic dystrophy using  
transgenic *C. elegans* as a model system (2/3)

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2320-B-040-013

執行期間：91年8月1日至92年7月31日

計畫主持人：蕭光明 中山醫學大學 生命科學系

共同主持人：潘惠錦 中山醫學大學 生命科學系

計畫參與人員：林明忠 中山醫學大學 生命科學系

陳冠宇 中山醫學大學 醫學研究所

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

執行單位：中山醫學大學 生命科學系

中華民國92年5月19日

# 行政院國家科學委員會專題研究計劃成果期中報告

## 利用基因轉殖線蟲研究肌強直肌肉萎縮症之致病機制(2/3)

Study of pathogenic mechanism of myotonic dystrophy using transgenic *C. elegans* as a model system

計劃編號：NSC 91-2320-B-040-013

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：蕭光明 中山醫學大學 生命科學系

共同主持人：潘惠錦 中山醫學大學 生命科學系

計畫參與人員：林明忠 中山醫學大學 生命科學系  
陳冠宇 中山醫學大學 醫學研究所

### 一、 中文摘要

位於 DMPK 基因 3'端非轉譯區內 CTG 三聯核酸重複序列之擴增突變已知會造成人體最常見之遺傳性神經肌肉方面的疾病，稱為強直型肌肉萎縮症(Dystrophia Myotonia, DM)。由於此一疾病之病徵多出現於青春期的後，在此研究中我們想了解擴增之 CTG 三聯核酸重複序列是否會造成不同發育時期線蟲基因表達及神經肌肉功能缺陷。首先，我們將帶有不同 CTG 序列長度之綠螢光蛋白(GFP)基因接入含線蟲肌肉細胞專一性驅動的載體。經顯微注射產生之線蟲共有 *myo3::gfp*，*myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>*，及 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 三種。其中，*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 蟲體之 GFP 表現量約只有 *myo3::gfp* 蟲體之 23%。經螢光顯微鏡分析結果顯示 GFP 表現量之降低主要發生在 L3 及之後階段。觀察線蟲各個時期的爬行軌跡顯示 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲在 L3 至 L4 時期出現不規則移動，顯示肌肉活動之不協調性。利用 phalloidin-rhodamine 染色觀察亦發現同一時期異常型態之肌肉細胞數目顯著增加。直到成蟲時，其爬行速度大幅下降而且咽喉肌電圖顯示其肌肉收縮及舒張程度明顯異常。因此，擴增 CTG 重複序列對線蟲生理效應隨個體發育而愈加明顯，最後並使蟲

體壽命減少一半左右。這些實驗結果證明過長的 CTG 重複序列會造成線蟲神經肌肉功能隨發育而逐漸喪失。

關鍵詞：基因轉殖線蟲，CTG 重複序列，GFP 基因表達，神經肌肉結構功能分析

### Abstract

Expansion mutation of CTG repeat length in the 3'-untranslated region of human DMPK gene causes a dominantly inherited muscular disease, called myotonic dystrophy type 1 (DM1). Most classic DM1 patients do not show clinical symptoms until early adulthood. In this study, we attempted to investigate whether the effect of expanded CTG repeats on gene expression and muscular function is developmentally dependent by using transgenic *C. elegans* as a model system. We made transgenic constructs in which CTG repeats was inserted into the 3'-untranslated region of GFP gene driven by muscle-specific promoter of *C. elegans*. Three transgenic worms, including *myo3::gfp*, *myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>*, and *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>*, were generated. Western blot analysis showed that the GFP protein level in worms expressing

GFP-(CUG)<sub>120</sub> RNA was about 24% of that in worms expressing GFP RNA. The CUG length-dependent decrease of GFP expression was evident from L3 stage. The *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* worms also displayed a time-dependent impairment of locomotion and muscle structure abnormalities. In adults, these worms showed significantly lower locomotion rate and electropharyngealgraphic response. Finally, we observed that they had only about half-length of life span of *myo3::gfp* animals. The present results first demonstrated the progressive nature of the effect of large CUG tract on gene expression and neuromuscular function *in vivo*.

Key words: Transgenic *C. elegans*, CTG repeats; gene expression, neuromuscular function.

## 二、緣由與目的

近年來陸續發現包括癌症、精神病、及遺傳病在內許多人類疾病是因為染色體內不穩定的核酸重複序列發生突變所致(Nelson 1996; Timchenko & Caskey 1996; Vincent et al. 2000; Wooster et al. 1994)。其中，發生於人體第十九對染色體長臂(19q13.3)上 DM protein kinase (DMPK)基因 3'端非轉譯區內一段 CTG 三聯核酸重複序列之擴增突變已知會造成人體最常見之遺傳性神經肌肉方面的疾病，稱為第一型強直型肌肉萎縮症(DM1; OMIN 160900)。正常人在 DMPK 3'-UTR 之 CTG 序列長度為 5 至 37 次，典型 DM1 病人的 CTG 序列長度擴增為 50 至 1000 次以上，而且，發病年齡多在青春期之後。其臨床主要的症狀為肌強直及漸進性肌肉無力及萎縮。此外，還會產生包括白內障、心臟傳導不良、男性不孕、糖尿病等多種症狀。此一 CTG 擴增突變造成多系統症狀之可能致病機制包括(i)影響包括 DMPK 及 SIX5 等基因表現。含擴增 CUG tract 之 DMPK RNA 被發現會在核內形成 foci，無法被送至細胞質，

進而造成 DMPK 蛋白量之降低。此外，序列擴增改變 chromatin structure (Otten and Tapscott 1995)，使臨近基因(SIX5)之轉錄受到抑制(Klessert et al. 1997; Thornton et al. 1997)。 (ii)突變的 DMPK RNA 會滯留在核內(Taneja et al. 1995; Davis et al. 1997)並 sequester 大量的 CUG-binding protein，如 muscleblind，造成顯性病理效應(Miller et al. 2000; Fardaei et al. 2002)。以基因轉殖及踢除小鼠模式研究顯示，Dmpk knockout mice 會出現 progressive myopathy (Reddy et al. 1996) and abnormal cardiac conduction (Berul et al. 1999)。當把老鼠體內的 SIX5 基因踢除，會產生白內障(Klesert et al. 2000; Sarker et al. 2000)。而表達含 250 CTG repeats 之肌動蛋白基因，會使老鼠發生肌強直及肌肉萎縮等典型 DM 症狀(Mankodi et al. 2000)。因此，DM 的主要致病機制似乎係透過含過長 CUG 序列之 RNA，而與 CUG 序列所在的 RNA 種類並無關係。

線蟲具有容易培養、生活史短、而且遺傳發育特性已深入瞭解等特徵。雖然 DMPK 在線蟲之同源基因，LET-502，在其 3'UTR 並不存在 CTG/CAG 重複序列，但此序列存在於線蟲基因體多處地方。並且，二種 CUG-binding proteins 稱為 ETR-1 及 muscleblind 在線蟲之同源基因與肌肉發育有關(Milne and Hodgkin 1999; Miller et al. 2000; Mankodi et al. 2001)。由於 DM 之致病機制很可能與此類 CUG-binding proteins 功能之變化有關，這意謂著擴增之 CTG 重複序列也會造成線蟲神經肌肉方面的缺陷。為證實此一想法並進一步建立 DM 症狀呈現與發育之關係的動物模式，我們進行此一研究。

## 三、結果

### 一、CTG 三聯核酸重複序列長度對 GFP 基因表達影響分析

首先，我們將包含不同生長時期的

F2 蟲體(mixed population)中蛋白抽出，以 Western blot 分析綠螢光蛋白的表現量。經過五次分別取自不同 F1 後代之實驗結果顯示 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 蟲體的綠螢光蛋白量約為 *myo-3::gfp* 蟲體的 24%。而 *myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 蟲體的綠螢光蛋白量約為 *myo-3::gfp* 蟲體的 62%。接著，為了解不同長度的 CTG 序列對所在基因在蟲體發育各階段表達之影響，我們利用螢光解剖顯微鏡觀察 *myo-3::gfp*、*myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>*、以及 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 共三種基因轉殖線蟲之綠螢光蛋白表現情形。每一種基因轉殖線蟲我們至少觀察 50 隻蟲體，結果顯示多數 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 蟲體之綠螢光強度在 L3 時期開始明顯變弱，至 L4/Adult 時幾乎觀察不到。相對地，*myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 蟲體之螢光強度變化較不明顯，即使到成蟲仍清楚可見。而 *myo-3::gfp* 蟲體在各個發育時期的螢光強度並無多大改變。因此，CTG 序列長度會隨發育時期對基因表達有不同程度的影響，使得綠螢光蛋白的表現量隨著發育而遞減，且長度愈長影響愈大。

## 二、線蟲咽喉肌電圖測量

由以上綠螢光蛋白各項分析的結果得知，在發育晚期的轉殖線蟲所受到的影響較明顯，為評估骨骼肌活性是否受到擴增之 CTG 或 CAG 三聯核酸重複序列影響，我們分析比較了各基因轉殖線蟲在 young adult 時期的肌肉電生理變化。波峰(E)代表肌肉收縮，而波谷(P)則代表肌肉舒張。在此實驗中，我們發現所分析之六隻 *myo-3::gfp* 線蟲之肌肉收縮電壓皆大於 2.0 mV，肌肉舒張電壓大於 2.2 mV。四隻受檢之 *myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 線蟲中，只有一隻其肌肉收縮電壓小於 2.0 mV。而在三次不同 DNA preparation 產生之 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲，至少 50%之線蟲的肌肉收縮出現異常(電壓小於 2.0 mV)，同時有 7~43%之(CTG)<sub>120</sub> 線蟲肌肉舒張電壓小於 2.2 mV。顯然，CTG 三聯核酸重複序列長度達 120 次時會造成骨骼肌活性的降低。

## 三、肌肉活動力及協調性分析

由肌肉電生理分析結果顯示 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲骨骼肌活性比 *myo-3::gfp* 線蟲為低，為進一步了解三聯核酸重複序列長度對肌肉活動力影響，我們比較了線蟲身體波動量化軌跡速率。在實驗過程中，若偶而有前進中，蟲體又往後收縮移動，或者蟲體已爬離菌叢情形，則不予計入實驗結果。首先，我們觀察到 *myo-3::gfp* 和 *myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 線蟲移動型態與正常非基因轉殖線蟲移動一樣，皆以 S 型前進且呈現正常規則彎曲。*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲移動基本上亦以 S 型前進，但其彎曲弧度則時大時小，呈現不規則變化。而這種不規則變化在 L4/Adult 時期更為明顯，顯示 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲肌肉協調性可能受到影響。不論其 S 型彎曲弧度，當比較這些線蟲三分鐘內移動 S 型次數，我們發現 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲移動速度顯然緩慢許多。*myo-3::gfp* 和 *myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 線蟲，身體波動量化軌跡速率平均每三分鐘移動約 50 次，而 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲則平均低於 30 次，在統計上有非常明顯差異。

## 四、線蟲肌肉結構之分析

在肌肉活動力分析中得知，*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 基因轉殖線蟲在 L4/Adult 時期肌肉協調性出現明顯異常。為了解他們的肌肉結構是否亦出現異常，我們利用 phalloidin-rhodamine 染色以比較不同時期的肌肉結構。由結果可知 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲在 L3 時期有 2 個以上異常肌肉結構的比例 43%。然而，在 L4 時期異常比例遽升為 85%。*myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 線蟲則一直約有 20%線蟲有 2 個以上異常肌肉細胞，此一比例之 *myo-3::gfp(CAG)<sub>5</sub>* 線蟲約為 10%。這些異常肌肉細胞可能是轉殖基因質體形成 extra-chromosome array 所造成，其數目不隨發育過程而改變。而 *myo-3::gfp* 線蟲則沒有發現結構異常的肌肉細胞。

## 四、討論

本研究中我們以線蟲動物模式來探討 CTG 三聯核酸重複序列長度對生物體發育過程中神經肌肉生理之效應。我們將非擴增性(5 repeats)及擴增性(120 repeats)之 CTG 序列置於綠螢光蛋白基因 3'端非轉譯區內，並表達在體壁肌肉細胞。由於線蟲生活史短，發育過程清楚，加上其簡單卻完整的神經肌肉組織，我們很容易分析或觀察轉殖基因所造成表現形之變化。

結果顯示 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲的螢光蛋白表現量比 *myo-3::gfp* 線蟲低很多，證明線蟲體內 CTG 序列長度過長會對所在基因之蛋白質生產有嚴重影響。而且這種影響與發育階段有明顯關係。在 L2 時期，不同序列長度之基因轉殖線蟲表現之螢光強度沒有顯著差異。L3 之後，120 次重複序列線蟲在螢光顯微鏡下已很難觀察。由於我們係觀察同一蟲體從 L2 至 adult 時期的螢光變化，此一發現不僅證明重複序列長度擴增會降低基因之表達，並首次顯示此一效應與發育過程之密切關係。此外，由於 DM1 病人在肌肉細胞核發現有 (CUG)<sub>n</sub> RNA foci retention 現象(Davies et al. 1997)，而在酵母菌體內含 98 (CUG/CAG) repeats 以上的 RNA 仍然可被正常運出核外(Fabre et al. 2002)，我們目前正利用螢光原位雜交(FISH)方法來進一步調查 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 線蟲是否亦有 GFP (CUG)<sub>120</sub> mRNA 留在核內造成 nuclear foci retention 現象，並因而降低 GFP 蛋白質之生產，而此現象是否只出現於 L3 時期以後的蟲體。

(CTG)<sub>120</sub> 序列除了會抑制 GFP 基因之表達，也明顯降低線蟲的活動力及肌肉協調性，造成肌肉電生理異常，並且改變了肌肉細胞的型態。這些影響隨發育進程而更加明顯。顯然，這些症狀之發生並非外生性 GFP 蛋白表現的結果，因為 *myo-3::gfp* 線蟲在這些方面表現與 *lin 15(-/-)* 非基因轉殖線蟲一樣正常。基因轉殖小鼠模式顯示 CTG 序列長度擴增會造成 myotonia 及 myopathy 等症

狀。我們的結果進一步顯示肌肉細胞內擴增之 CTG 重複序列也會對線蟲造成類似影響。由於轉殖基因係以 extra-chromosomal array 形式存在於蟲體，因此不論其所在基因位置，只要表達出含過長 CUG 之 mRNA 皆會造成神經肌肉細胞生理變化。近年來研究報告指出，擴增之 (CUG)<sub>n</sub> RNA 除了影響所在基因的 polyadenylation (Wang et al. 1995) 及 splicing (Philips et al. 1998)，它亦可能透過 sequester CUG binding proteins, 如 ETR-1 (Milne and Hodgkin 1999)，CUGBP1 (Timchenko et al. 2001)，以及 muscleblind (Miller et al. 2000; Mankodi et al. 2001)，而影響其他 CUG-containing RNA 之代謝。目前已證明線蟲體內存在 CTG 序列結合蛋白的同源基因，為我們的發現提供一合理解釋。

對於人及老鼠等哺乳類而言，(CTG/CAG)<sub>5-20</sub> 是一正常序列長度，在線蟲基因體內亦存在多個 (CTG/CAG)<sub>2-10</sub> 序列。我們的結果亦顯示 *myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 不會對線蟲之活動力造成明顯影響，亦不會使所在基因之表達大幅下降。至於有大約 20% 的 *myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 線蟲含有二個或以上異常肌肉細胞，有可能是轉殖基因形成的 extrachromosome array 含多個 (CTG)<sub>5</sub> 序列 copies 因而造成類似 CTG 擴增之效應。為進一步了解相關致病機制，尋找受到 GFP (CUG)<sub>120</sub> RNA 影響之下游基因成為重要的下一步。目前已知有 insulin receptor (Morrone et al. 1997)，troponin (Philips et al. 1998)，tau (Sergeant et al. 2001) 等基因之 splicing 或 expression 在 DM1 病人細胞內會發生變化。基本上，這些基因或含有 CTG tract，或是構成肌肉細胞骨架重要分子。由於我們觀察到 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 基因轉殖線蟲肌肉細胞型態及功能發生變化，未來，我們將利用免疫染色方法來了解是否與肌肉細胞分化有關蛋白質，如 myoD, myf5, myogenin，的表現出現異常。此外，亦可用定量 RT-PCR 調查此類基因轉錄表現情形。

五、成果自評

研究進度大致與預期符合。過去一年之中，我們已建立基因轉殖線蟲之動物模式並進而證實擴增之 CTG 三聯核酸重複序列的生理效應與生物體的發育有關。對於這些發現目前正整理結果準備文章中 (in preparation)。

## 六、參考文獻

- Berul, C. I., Maguire, C. T., Aronovitz, M. J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrman, J., Housman, D., Mendelsohn, M. E., and Reddy, S. (1999) DMPK dosage alternations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J. Clin. Invest.* 103(4), R1-7.
- 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 (14), 7388-7393.
- Fabre, E., Dujon, B., Richard, G. F. (2002) Transcription and nuclear transport of CAG/CTG trinucleotide repeats in yeast. *Nucleic Acids Res* 30(16), 3540-3547.
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., 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(7), 805-814.
- Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D., and Tapscott, S. J. (1997) Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nature Genet.* 16, 402-406.
- Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E. C., Soriano, P., and Tapscott, S. J. (2000) Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nature Genet.* 25, 105-109.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C., A. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1772.
- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S., Thornton, C. A. (2001) Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* 10(19):2165-2170.
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-umnuay, P., Stenberg, M. G., Bryne, B. J., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expressions associated with myotonic dystrophy. *The EMBO J.* 19 (17), 4439-4448.
- Milne, C. A., and Hodgkin, J. (1999) ETR-1, a homologue of a protein linked to myotonic dystrophy, is essential for muscle development in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 9, 1243-1246.
- Morrone, A., Pegoraro, E., Angelini, C., Zammarchi, E., Marconi, G., and Hoffman, E. (1997) RNA metabolism in myotonic dystrophy: patient muscle shows decreased insulin receptor RNA and protein consistent with abnormal insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 99, 1691-1698.
- Nelson, D. L. (1996) Allelic expansion underlies many genetic diseases. *Growth: Genetics & Hormones* 12, 1-4.
- Otten, A.D. and Tapscott, S. J. (1995) Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5465-5469.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., and Cooper, T.A. (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.
- Reddy, S., Smith, D. B. J., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M.,

- Tran, K., rayburn, H., Bronson, R., Cros D., Balice-Gordon, R. J., and Housman, D. (1996) Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nature Genet.* 13, 325-335.
- Sarker, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., and Reddy, S. (2000) Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nature Genet.* 25, 110-114.
- Sergeant N, Sablonniere B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maurage CA, Wattez A, Vermersch P, Delacourte A (2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10(19), 2143-2155.
- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R. H. (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissue. *J. Cell Biol.* 128, 995-1002.
- Thornton C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., and Moxley, R. T. (1997) Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking *DMAHP* gene. *Nature Genet.* 16, 407-409.
- Timchenko, L. T., and Caskey, C. T. (1996) Trinucleotide repeat disorders in humans: discussions of mechanisms and medical issues. *FASEB J.* 10, 1589-1597.
- Timchenko, N.A., Iakova, P., Cai, Z. J., Smith, J. R., and Timchenko, L.T. (2001) Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol. Cell. Biol.* 21 (20), 6927-6938.
- Vincent, J. B., Paterson, A. D., Strong, E., Petronis, A., and Kennedy, J. L. (2000) The unstable trinucleotide repeat story of major psychosis. *Am. J. Med. Genet.* 97, 77-97.
- Wang, Y.-H. and Griffith, J. (1995) Expanded CTG triplet blocks from the myotonic dystrophy gene create the strongest known natural nucleosome positioning elements. *Genomics* 25, 570-573.
- Wooster, R., Cleton-Jansen, A. M., Collins, N., Mangion, J., Cornelis, R. S., Cooper, C. S., Gusteson, B. A., Ponder, B. A., von Deimling, A., Wiestler, O. D., et al. (1994) Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genet.* 6, 152-156.