

序論

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)。其中由三聯核酸重複序列倍增突變所導致的遺傳疾病至少有十四種(Cummings and Zoghbi 2000)。按照核酸重複序列是否會被轉譯，這類疾病可分成二類。第一類疾病，包括易脆 X 染色體症候群(Fragile X syndrome, CGG repeat size 60-200 or >230)、Fragile XE syndrome (GCC repeat size 61-200 or >200)、Friedreich ataxia (GAA repeat size 34-80 or >100)、肌強直型肌肉萎縮症(Dystrophia myotonia, CTG repeat size 50-1000)、小腦脊髓幹運動失調症候群第八型(Spinocerebellar ataxia type 8, CTG repeat size 110 to <200)及小腦脊髓幹運動失調症候群第十二型(Spinocerebellar ataxia type 12, CAG repeat size 66-78)，這類是由位於不轉譯區(untranslated region, UTR)內之重複序列不正常增長所導致。第二類疾病統稱為“polyglutamine disease”有：亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、Kennedy disease、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症(Dentatorubral-pallidoluysian atrophy 又稱 Haw-River syndrome)及小腦脊髓幹運動失調症候群第一、二、三、六及七型 Spinocerebellar ataxias (type 1,2,3,6, and 7)，其特徵為位於轉譯

區(translated region)內一段不穩定的 CAG 核酸重複序列擴增突變(expansion mutation)而造成之神經退化性疾病(neurodegenerative disease)。

強直型肌肉萎縮症(DM)是成人肌肉萎縮症中最常出現的一種神經肌肉方面的體染色體顯性遺傳疾病。在臨床症狀的表現上主要包括肌肉收縮後不易放鬆、肌肉（臉部、頸部、和四肢）無力及漸進性萎縮等。除此之外亦可能影響眼睛、腦、皮膚、肺、心臟等器官及內分泌系統而出現白內障、智能障礙、禿頭、肺炎、心臟傳導缺陷、糖尿病、和男性不孕等症狀。根據造成此一多系統疾病的基因突變情形，DM 至少有二種型式。最常發現的 DM 型式係因位於第十九對染色體長臂(19q13.3)上 DM protein kinase (DMPK)基因 3'-untranslated region (3'-UTR)內一段 CTG 三聯核酸重複序列發生擴增突變所導致 (Brook et al. 1992 ; Fu et al. 1992 ; Mahadevan et al. 1992)，稱為 DM1 (OMIM 160900 ; The IDMC 2000)。此段 CTG 三聯核酸重複序列亦位於緊鄰的下游基因，SIX5 之驅動子區域內。在正常人的染色體內，此段 CTG 核酸重複次數是 5-35 次，而 DM 患者之 CTG 數目則超過 50 次，甚至可達數千次之多。若重複次數在 50-200 次之間，則大多無臨床症狀(asymptomatic carriers)或僅有輕微肌肉無力、白內障等症狀(benign DM)。隨著 CTG 核酸重複次數之增加，DM 患者之臨床症狀也愈加

明顯；如超過 200 次以上，則顯現出典型肌強直症神經肌肉的特徵，並伴隨漸進性肌肉無力和四肢末端萎縮。典型的 DM (classic DM) 多在成人或成人早期(15~40 歲)開始發病，其 CTG 核酸重複次數絕大多數在 1000 次以下。最嚴重的 DM 型式是先天性的強直型肌肉萎縮症 (congenital myotonic dystrophy，簡稱 CDM)，其臨床症狀通常在出生前或出生時就已顯現出來，此類患者的 CTG 核酸重複次數大多在 1000 次以上。主要症狀包括低肌張(hypotonia)、呼吸無力、發育遲緩等。所以 CTG 擴增重複序列的長度與患者的發病年齡成反比，而和疾病的嚴重程度成正比，其(CTG) n 的 n 值愈大，通常發病年齡越早，而且發病症狀也越嚴重。第二種 DM 型式 (DM2; OMIM 602668)，與 DM1 的臨床症狀幾乎一樣，是因位於第三對染色體長臂 (3q21) 上鋅手指蛋白(zinc finger protein 9, ZNF9)，基因的第一個 intron 內一段 CCTG 四聯核酸重複序列發生擴增突變(50~100,000 repeats)所導致 (Liquori et al. 2001)。

這二種 microsatellite 擴增突變皆發生於主要表達在肌肉細胞之基因的非密碼區(non-coding region)，不會改變所在基因之蛋白質特性。因此，其作用之分子機制可能透過改變 DMPK 及 ZNF9 等基因之轉錄效率以及 RNA 正常之加工處理(processing)和運輸(transportation)。此一說法係假設 DMPK 及 ZNF9 基因作用在同一細胞內途徑，因而

影響到同樣細胞功能，造成相同臨床症狀。目前對於 DM2 病人體內 ZNF9 基因表達及其 RNA processing 和 transportation 情形尚不清楚。就 DMPK 而言，有報告指出 DM1 病人 DMPK 的 RNA 和蛋白質濃度皆比正常人低，顯示 CTG 擴增突變直接影響 DMPK 基因的表現 (Hofmann-Radvany et al. 1993 ; Fu et al. 1992)。此外，擴增後之 CUG tract 可能會使得 DMPK RNA 無法被送出核外造成核滯留(nuclear retention) (Davis et al. 1997)。最近的研究顯示 CUG tract 亦會影響 DMPK RNA 的 processing，使得 DMPK mRNA isoforms 在核內外的 ratio 發生改變(Tiscornia and Mahadevan 2000)。為探討 DMPK 基因與 DM 疾病之間的相關性，Reddy 及 Jansen 等人利用基因剔除(gene knock-out)技術把 DMPK 基因從正常的老鼠體內剔除，他們發現這些老鼠有晚發性漸進性肌病(progressive myopathy)產生，並出現心臟傳導不良，甚至因而喪失生命之情形，但並沒有出現肌強直、肌肉萎縮等典型 DM 症狀，顯示 DMPK 在維持骨骼肌的構造及功能上是必須的，卻不是造成 DM 的唯一關鍵因素 (Reddy et al. 1996 ; Jansen et al. 1996 ; Berul et al. 1999)。

此外，CTG 的倍增突變會改變臨近區域染色體的構造(Otten et al. 1995)，造成很強的核體位置元素(nucleosome positioning elements) (Wang et al. 1994 ; Wang et al. 1995)。核體 (nucleosome) 是染色體構

造的基本單位，由 146 bp DNA 纏繞八個組織蛋白複合體(octamer of histone proteins)而形成，此種構造會抑制轉錄之進行使基因無法表達。由於 nucleosome 形成的效率隨 CTG 的倍增程度而增加，所以 CTG 的倍增突變有可能影響到某些基因(如 SIX5，亦稱為 DMAHP)之表達而造成強直型肌肉萎縮症。Klesert 及 Thornton 等人觀察到 DM 患者肌肉細胞內 SIX5 之 RNA level 較正常人為低(Klesert et al. 1997; Thornton et al. 1997)，而且是隨 CTG 倍增程度之增加而降低。由於 SIX5 是一 homeodomain-encoding gene，其基因產物很有可能是一種與個體發育有關的轉錄因子。利用 β -gal 為 reporter gene 接至 SIX5 基因驅動子(promoter)區域之下游而做成融合基因(fusion gene)，然後以轉殖動物(transgenic mice)當模型，Heath 等人(1997)觀察此 fusion gene 在老鼠胚胎發育過程之表達發現 SIX5 基因之驅動子在 12.5 天的鼠胚胎即活化，而且在多個出現 DM 臨床症狀的器官有活性。雖然他們的結果並不能代表真正活體(*in vivo*)的情形，這些觀察也顯示 SIX5 是一與個體發育有關的基因，並且 CTG 倍增突變造成 SIX5 基因表達之不足(haplo-insufficiency)可能與 DM 的多系統臨床症狀有關。的確，基因轉殖小鼠模式的研究證實 SIX5 gene loss 會造成白內障(Klesert et al. 2000; Sarker et al. 2000)。

除了對基因表現有影響之外，最近愈來愈多證據顯示 CTG 倍增

使得 DMPK RNA 上 CUG 重複數目增加，因而搶走過多的 CUG-binding protein，造成”gain-of-function mutation”，干擾或破壞其他 CUG-containing RNA 之代謝和運輸 (Wang et al. 1995; Korade-Mirnic et al. 1998)。例如，胰臟素接受體訊息核糖核酸(insulin receptor mRNA)之 level 在 DM 病人肌肉內比正常肌肉組織為低 (Morrone et al. 1997)。Human cardiac troponin (cTNT) RNA 之正常剪接(splicing)在 DM 病人橫紋肌及在表達出含 CUG 序列 RNA 之正常細胞內會被破壞(Philips et al. 1998)。此二個基因都含有 CTG repeat。利用基因轉殖小鼠模型，Mankodi et al. (2000)的研究結果顯示 expanded (CUG)_n repeats 的確會造成肌強直(myotonia)及肌病變(myopathy)等 DM 之主要症狀。將帶有 300 個 CTG 重複序列之人類 DMPK 基因轉殖至老鼠體內，Seznec (2001)以動物模式更完整地重現 DM 臨床病變，並且更進一步顯示 CUG expansion 之 trans-dominant effect 不僅作用在肌肉，亦造成腦部異常。最近，DM1 病人體內 muscle-specific chloride channel RNA 的異常剪接已被證明是因 CUG expansion 造成 CUG-BP (CUGBP 家族蛋白的成員之一)過度表達的關係，並因而呈現肌強直症狀(Charlet-B et al. 2002; Mankodi et al. 2002)。

近年來，DMPK 及 SIX5 在 *C. elegans* genome 的同源基因

(homologue), LET-502 and ceh-32 相繼被發現(Wissmann et al. 1997 ; Cassata et al. 1999)。有趣的是這二個基因，LET-502 與 *C. elegans* 胚胎發育過程中的皮下細胞外形改變(hypodermal cell shape change)有關而 ceh-32 可能造成 Vab phenotype (notched head)，似乎和身體肌肉功能沒有直接關係。最近，*C. elegans* 體內一種肌肉特異性的 RNA binding protein (muscle specific RBP)，稱為 ETR-1 (ELAV-type RNA-binding protein)，被發現與肌肉發育有關(Milne and Hodgkin 1999)。同時，我們也發現 *C. elegans* 基因體存在一類 triplet repeat expansion (EXP) RNA-binding protein 基因，與 *Drosophila* muscleblind (Begemann et al. 1997)屬同源基因(Hsiao et al. unpublished data)。

Muscleblind 參與果蠅肌肉形成(Artero et al. 1998)並在 DM1 及 DM2 病人體內被發現與 DMPK RNA colocalize 在同一 nuclear foci (Mankodi et al. 2001)。以上研究結果顯示擴增突變之 CUG tract 亦可能在 *C. elegans* 以及其他低等生物造成神經肌肉方面之症狀。為在 in vivo 情況下探討擴增突變之 CUG tract 在生物發育過程之生理效應，並考慮到(1)基因轉殖動物遺傳發育特性之瞭解，(2)肌肉疾病呈現症狀之研究的便利，及(3)飼養容易、飼養空間不大及繁殖能力強等因素；在本研究中，我們利用基因轉殖線蟲(transgenic *C. elegans*)探討 3'-UTR 內 CTG 三聯核酸重複序列長度對線蟲肌肉活動力、蟲體移動

(肌肉協調性)、以及對轉殖基因之表達等等之影響。希望經由建立此一模式有助於 DM 致病機制闡釋以及對於疾病相關基因在線蟲之生理功能有更深入瞭解。此外，為進一步研究各類核酸重複序列擴增突變對生物體在發育及生理上影響，我們也探討 3'-UTR 內 CAG 三聯核酸重複序列長度對線蟲之效應。