

## 討論

本研究中我們以線蟲作為動物模式探討不同長度之 CTG 及 CAG 三聯核酸重複序列對基因表達及肌肉生理結構功能之效應。為此，我們將非擴增性(5 repeats)及擴增性(120 repeats)之 CTG 及 CAG 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，進而發現含擴增性 CTG 及 CAG 序列轉殖基因之線蟲產生蛋白質產物之效率大為降低並造成其肌肉細胞組織結構病變及功能部分喪失。而且，這些影響隨發育過程愈來愈明顯。

### 一、CTG 及 CAG 三聯核酸重複序列對 GFP 基因表達之影響

將含不同長度之 CTG 及 CAG 三聯核酸重複序列之綠螢光蛋白基因以顯微注射的方式殖入線蟲體內表達，結果顯示 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 及 *myo-3::gfp(CAG)<sub>120</sub>* 基因轉殖線蟲在 L3 時期有 30%的蟲體綠螢光蛋白表現開始明顯減弱，在 Adult 時高達 90%的蟲體綠螢光蛋白已偵測不到。*myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 及 *myo-3::gfp(CAG)<sub>5</sub>* 線蟲的綠螢光蛋白在 L2 到 Adult 則無明顯變化。先前我們實驗室用”mixed-population”之蟲體蛋白質進行 western blot 的結果發現 *myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 與 *myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>* 蟲體的綠螢光蛋白量約為 *myo-3::gfp* 蟲體的 24%及 62%(江淑雅碩士論文 2002)。這些結果顯示擴增的 CTG 及 CAG 三聯核酸重複序列的確會降低所在基因之蛋白質表達，而且隨著發育進程此

種影響愈來愈顯著。這是首次發現非轉譯區內 CAG 序列擴增亦會造成類似 CTG 序列對基因表達之影響，也是第一個 *in vivo* 證據顯示 CTG 及 CAG 序列對基因表達之影響與個體發育有關聯。

## 二、線蟲的蠕動及肌肉型態

*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>*和*myo-3::gfp(CAG)<sub>120</sub>*除了會抑制GFP基因之表達，也明顯降低線蟲的肌肉協調性及活動力(圖二及圖三)。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。由蠕動軌跡紀錄可看出部分*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>*和*myo-3::gfp(CAG)<sub>120</sub>*轉殖基因線蟲在L3時期的幼蟲就開始出現弧度時大時小的S型彎曲，至L4/Adult時異常蠕動軌跡更加明顯。亦有些長大至L4/Adult時期才有較為異常之蠕動軌跡。因此，三聯核酸序列擴增對肌肉生理之影響存在有個體差異，其中原因目前尚不清楚。除了蠕動軌跡出現異常，*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>*和*myo-3::gfp(CAG)<sub>120</sub>*線蟲的移動速率亦明顯減緩很多。在Adult時期*myo-3::gfp*、*myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>*和*myo-3::gfp(CAG)<sub>5</sub>*線蟲平均每三分鐘移動約50次，而*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>*和*myo-3::gfp(CAG)<sub>120</sub>*線蟲則平均低於30次，顯示其肌肉功能已下降。由phalloidin染色結果(圖四)可知肌肉結構亦明顯改變了，而且肌肉結構之變化與發育有密切關係。在L2時期，*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>*和*myo-3::gfp(CAG)<sub>120</sub>*線

蟲只有20~40%的蟲體含異常肌肉細胞（圖五），至L4/Adult時期則有80%以上的線蟲含異常肌肉細胞；這個結果顯示CTG及CAG三聯核酸重複序列擴增對於線蟲肌肉的影響隨發育階段而顯現出來。初步以電子顯微鏡觀察橫切的肌肉細胞（圖六）顯示*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>*線蟲的basement membrane插入肌肉細胞之間，且沒有明顯的M line，而*myo-3::gfp(CAG)<sub>120</sub>*線蟲肌肉細胞的dense body已消失。相對地，*myo-3::gfp*、*myo-3::gfp(CTG)<sub>5</sub>*和*myo-3::gfp(CAG)<sub>5</sub>*線蟲的細胞型態及結構則完全正常。目前我們正觀察更多的轉殖基因線蟲以確定此結果。

### 三、RNA foci

我們進一步利用螢光原位雜交 (FISH) 方法發現*myo-3::gfp(CTG)<sub>120</sub>* 和 *myo-3::gfp (CAG)<sub>120</sub>* 線蟲確有 GFP (CUG)<sub>120</sub> mRNA 留在核內造成 nuclear foci retention，而此現象只出現於 L3 時期以後的蟲體。這些結果表示 GFP 蛋白質生產量之降低可能與 RNA foci 之形成有關。先前報告指出 DM1 病人以及含(CTG)<sub>250</sub> 序列之轉殖基因小鼠在肌肉細胞核皆有(CUG)<sub>n</sub> RNA foci retention 現象(Davies et al. 1997; Mankodi et al. 2000)，而在酵母菌體內含(CUG/CAG)<sub>98</sub> 序列的 RNA 仍然可被正常運出核外(Fabre et al. 2002)。這些不同結果之觀察可能是因物種差異，所含三聯核酸序列長度不同，或者其他因

素所造成。

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。至於 untranslated CAG repeats expansion 的作用機制亦有可能透過 CAG repeat-containing RNA binding proteins。已有報告指出人體內存在有此類蛋白質，而且此類蛋白質可能參與三聯核酸重複序列神經疾病的致病過程(McLaughlin et al. 1996)。在老鼠體內的相關基因已被選殖出來(Yano et al. 1999)，若能證明線蟲體內存在 CAG 序列結合蛋白的同源基因，那將為我們的發現提供一合理解釋。再者，是否所有種類之三聯核酸重複序列擴增都會造成同樣影響?有無可能我們所看到的現象其實是非專一性的影響，也就是說，任何 360 bp 的 DNA 片段置於 *myo3::gfp* 的 3'UTR 然後殖入線蟲都會造成同樣結果?目前，我們正選殖其他三聯核酸重複序列，如 GAA，GAG，以及不含三聯核酸重複序列的λDNA 片段，並進行基因轉殖實驗以回答上述問題。

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>* 和 *myo-3::gfp(CAG)<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(圖七)。此外，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>* 與 *myo-3::gfp(CAG)<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。

到目前為止雖然仍未有任何證據顯示(CAG)<sub>n</sub> 三聯核酸重複序列在 3'UTR 發生擴增突變會造成人體疾病，我們的實驗結果顯示 3'UTR (CAG)<sub>n</sub> 三聯核酸重複序列的擴增突變會使得線蟲動作電位產生異常變化，使其活動力降低，並使肌肉協調性喪失以及改變肌肉結構型

態。而這些影響隨線蟲的發育逐漸明顯。目前已知的非轉譯區三聯核酸序列擴增疾病，包括強直型肌肉萎縮症和第八型小腦脊髓運動失調症，都與個體發育過程有關。本研究建立線蟲作為此類疾病的模式動物，希望能更深入了解三聯核酸重複序列擴增後在生物體各發育時期的影響，並進而闡釋其致病機制。