

第一章

CTG/CAG 重複序列對發育中線蟲的影響

Developmentally regulated effects of expanded CTG /CAG
repeats in *Caenorhabditis elegans*



中文摘要

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第一型 (Dystrophia myotonia type 1, DM1)。由於此一疾病之病徵多出現於青春期之後，在此研究中我們利用線蟲想了解擴增之 CTG 及 CAG 三聯核酸重複序列致病效應與個體發育之關係。首先，我們將帶有不同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 *myo-3::gfp*，*myo-3::gfp(CAG)₅*，*myo-3::gfp(CTG)₅*，*myo-3::gfp(CAG)₁₂₀*，及 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 五種。經螢光顯微鏡分析結果顯示擴增之 CTG 及 CAG 序列皆使得 GFP 表現量明顯降低，而此螢光亮度之減弱開始於 L3 階段，至 Adult 階段幾乎已無法偵測。觀察線蟲各個時期的爬行軌跡顯示 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 及 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 線蟲在 L3 時期開始出現較清楚異常軌跡，顯示肌肉活動之不協調性。成蟲時，其爬行速度亦大幅下降。利用 phalloidin-rhodamine 染色分析發現 L3 至 L4 時期其異常型態之肌肉細胞數目顯著增加。電子顯微鏡觀察清楚顯示 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 蟲體肌肉細胞間之 dense body 已不存在，而在 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 蟲體，原本存在肌肉束與表皮細胞之間的 basement membrane，亦被發現在肌肉細胞內的肌肉束中間。進一步以螢光原位雜交技術我們發現 GFP-(CUG)₁₂₀ foci 僅存在於成蟲細胞核內，L2

幼蟲中並不存在，顯示 RNA foci 之形成亦與發育有關，並可能因而造成 GFP 表現量的減少以及引發病理機制。這些實驗結果首次證明過長 CAG 重複序列亦會造成線蟲肌肉結構功能喪失，而無論是擴增 CTG 或 CAG 序列之影響皆與發育有密切關係。