

結果

一、CTG 及 CAG 三聯核酸重複序列長度對 GFP 基因表達影響分析

為了解不同長度的 CTG 及 CAG 序列（圖一 A）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)₅*、*myo-3::gfp(CTG)₁₂₀*、*myo-3::gfp(CAG)₅*、以及 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 共五種基因轉殖線蟲從 L2 至 Adult 時期綠螢光蛋白表現情形(圖一 B)。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)₁₂₀* 和 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 蟲體之綠螢光強度在 L3 至 L4 時期開始明顯變弱，至 Adult 時幾乎觀察不到。相對地，*myo-3::gfp(CTG)₅* 及 *myo-3::gfp(CAG)₅* 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，擴增之 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、肌肉活動力及協調性分析

為了解三聯核酸重複序列長度對肌肉活動力影響，我們記錄轉殖基因線蟲的蠕動軌跡以及比較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*、*myo-3::gfp(CTG)₅*、和 *myo-3::gfp(CAG)₅* 線蟲其移動型態與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。而 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 和 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 線蟲基本上移動正常，很多時候亦以 S 型前進，但其行進時之彎曲弧度則時大時小，呈現不規則變化。而這種不規則變化約有 35% 在 L3 時期即出現，在長至 L4/adult 時期不規則移動情形更為明顯，有 45% 到 L4 或 adult 時才出現(圖二)。這些結果顯示 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 和 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 線蟲肌肉活動協調性會受到 CTG 及 CAG 序列長度影響，而且此一影響會隨發育過程愈來愈明顯。此外，當比較這些線蟲在 adult 時期蟲體之移動速度，不論其 S 型彎曲弧度，我們進一步發現 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 和 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 線蟲在單位時間內移動之 S 型次數比 *myo-3::gfp*、*myo-3::gfp(CTG)₅* 和 *myo-3::gfp(CAG)₅* 線蟲減少約 15%(圖三)。身體波動量化軌跡速率，*myo-3::gfp*、*myo-3::gfp(CTG)₅* 和 *myo-3::gfp(CAG)₅* 線蟲平均每三分鐘移動約 50 次，而 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 和 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 線蟲則平均每三分鐘移動低於 30 次，其活動力明顯差很多。

三、線蟲肌肉結構之分析

在肌肉活動力分析中得知，超過 80%之 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 和 *myo-3::gfp (CAG)₁₂₀* 線蟲在 L4/adult 時期肌肉協調性出現明顯異常。為了解他們的肌肉細胞型態是否亦產生變化，我們利用 phalloidin-rhodamine 染色以比較各轉殖基因線蟲在發育不同時期的肌肉結構(圖四)。相對於正常肌肉細胞之平滑狀，有 94%的 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 及 89%的 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 成蟲含有一個或一個以上呈現波浪狀肌肉細胞，其中以 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 線蟲肌肉細胞異常的程度最為嚴重。如圖四所示，這種異常肌肉細胞之產生亦發現在 L2 之幼蟲。每一種轉殖基因線蟲經觀察超過 30 隻蟲體後，我們發現 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 和 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 線蟲在 L3 時期有異常肌肉結構的比例分別為 43%及 15%，跟在 L2 時期差不多。然而，在 L4 時期此一比例分別遽升為 85%及 75%(圖五)。至成蟲階段，每隻 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 和 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 蟲體所含有的異常肌肉細胞數目平均分別為 9.2 和 11.6。同時，這些異常的體壁肌肉細胞都位在生殖孔以上蟲體背部兩側肌肉束內。而 *myo-3::gfp(CTG)₅* 及 *myo-3::gfp(CAG)₅* 線蟲雖然分別約有 20%及 9%蟲體含有異常型態的肌肉細胞，值得注意的是，此一比例並不隨著發育過程而有明顯的變化且這些蟲體至成蟲階段時其異常肌肉細胞的比例也較低(平均分別為 1.4 及 1.8)。至於 *myo-3::gfp* 線蟲則沒有發現結構異常的肌肉細胞。

四、線蟲肌肉細胞內部構造之分析電子顯微鏡觀測

為進一步了解具異常型態之肌肉細胞的內部構造，我們將橫切的肌肉細胞切片以穿透式電子顯微鏡觀察(20000X)。如圖六所示，*myo-3::gfp*、*myo-3::gfp(CTG)₅* 和 *myo-3::gfp(CAG)₅* 線蟲其橫切細胞的構型，包括 basement membrane 及 dense body，都很正常。相對地，*myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 及 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 蟲體的橫切面肌肉細胞外形明顯較不規則，其中原本存在於表皮細胞與肌肉細胞中間的 basement membrane，在 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 蟲體內已深入至肌肉細胞內，且沒有明顯的 M line，而原本存在於肌肉束的 dense body，在 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 蟲體內已觀察不到，使肌肉束連成一片而無法辨。這些結果顯示無論是 CTG 或 CAG 重複序列，擴增後都會嚴重影響肌肉細胞之組織結構。

五、RNA foci 之偵測

GFP蛋白表現量的減少及肌肉功能結構之改變皆可能與 GFP-(CUG)₁₂₀ RNA之代謝運輸受到阻礙有關。已知DM1病人之肌肉細胞核內會有 *DMPK* RNA之堆積，為調查含GFP-(CUG)₁₂₀及 -(CAG)₁₂₀之RNA是否在線蟲體內細胞核堆積，我們以螢光原位雜交法進行此一研究(圖七)。首先，所有的線蟲都以DAPI染細胞核，在螢光顯微鏡下可以清楚看到呈現藍色的細胞核，其中生殖細胞的細胞核

較小，而肌肉細胞的細胞核較大。接著，以在螢光顯微鏡下呈紅色之CYC3-(CAG)₁₃探針偵測GFP-(CUG)₁₂₀ RNA，將探針的訊號與DAPI的影像重疊在一起，據此判斷RNA是否堆積在細胞核內。我們觀察了12隻*myo-3::gfp(CTG)₁₂₀*成蟲，其中8隻之肌肉細胞的細胞核有紅色CYC3的焦點訊號，表示GFP-(CUG)₁₂₀ RNA的確形成foci而存在於細胞核。此外，我們觀察了20隻*myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* L2時期的幼蟲，並無發現有RNA foci的現象。當以CYC3-(CTG)₁₃當作探針，在所有蟲體都沒有偵測到任何訊號出現在肌肉細胞；同時以CYC3-(CAG)₁₃探針偵測*myo-3::gfp*、*myo-3::gfp(CTG)₅*和*myo-3::gfp(CAG)₅*線蟲也沒偵測到訊號，顯示所測得之訊號不是非特異性結合所產生。這些結果顯示GFP-(CUG)₁₂₀ RNA foci的形成可能是在L3或者之後的階段。而是否有GFP-(CAG)₁₂₀ RNA foci的形成則有待進一步調查。