

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

Intron 抑制斑馬魚 myf-5 基因表現的關鍵序列

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-078-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學漁業科學研究所

計畫主持人：蔡懷楨

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 24 日

中文摘要

Myf-5 是肌肉特異性轉錄因子之一，參與調控肌原纖維及肌肉細胞的增生和分化。目前對於調控 *myf-5* 基因的 *cis-acting element* 並不十分清楚，故本實驗利用基因轉殖的技術，以斑馬魚 (*Danio rerio*) 作為實驗材料，研究參與調控 *myf-5* 基因組織及時期專一表現的區域。在構築質體中，其中包含斑馬魚 *myf-5* 上游調控區 -9977 至 -1 (-9977/-1), exon 1 (E1), intron 1 (I1), exon 2 (E2) 再 in frame 結合 GFP cDNA [(-9977/-1)/E1/I1/E2/GFP]，以顯微注射方式將其注射至單細胞時期的斑馬魚胚胎中。結果顯示螢光在體節專一表現率僅 2 %；相對地，在不含有 E1/I1/E2 序列之質體 (-9977/-1)/GFP 螢光表現率卻有 94 %。相同的顯微注射結果也被觀察到在 -8600/-1, -2937/-1 和 -290/-1 結合 E1/I1/E2/GFP 的實驗中。進一步地運用連續性剔除造成不同長度的 intron 1 片段，構築質體 -2937/-1/GFP 連接 intron 1 片段 +502/+2503, +1174/+2503, +1768/+2503, +790/+1489, +1467/+2152, +502/+1787, +502/+1199, +502/+835 和 +502/+659，經顯微注射發現，轉殖胚胎體節專一螢光表現率分別為 2, 90, 88, 87, 83, 12, 10, 8 及 83 % (質體 -2937/-1/GFP 螢光表現率為 84 %)，表示 intron 1 中的 +659/+835 序列有能力抑制螢光載體節專一的表現。並且在剔除質體 (-2937/-1)/GFP/(+502/+1199) 中之 +660/+816 序列，注射後體節專一螢光表現率即會上升至 91 %。由上述證據顯示，intron 1 的 +660/+816 序列抑制了 *myf-5* 上游調控區的表現，而且發現其抑制能力是具有位置及方向的特異性。因此，*myf-5* intron 1 內 +660/+816 序列，可能在斑馬魚 *myf-5* 組織特異性及發育時期特異性表現上扮演重要角色。

英文摘要

Myf-5 is the one of the muscle regulatory factors involved in the proliferation of myoblasts and differentiation of myogenic cells. Yet, the *cis-regulatory elements* of *myf-5* gene are not clearly defined. Due to no particularly suitable cell-lines available for analyzing the gene regulation of zebrafish *myf-5*, *in vivo* transgenic assay was employed. A plasmid which contained zebrafish *myf-5* gene upstream regulatory sequence from -9977 to -1 (-9977/-1), exon 1 (E1), intron 1 (I1), exon 2 (E2) and in frame fused with GFP [(-9977/-1)/E1/I1/E2/GFP], was constructed and microinjected into one-cell embryos. Surprisingly, the somite-specific expression rate was extremely low (2 %, n=392), compared to that (94 %) of embryos injected with (-9977/-1)/GFP. Similar results were also obtained by injecting the constructs of E1/I1/E2/GFP but fused with -7710/-1, -2937/-1 and -290/-1. To further study the regulatory elements within the intron, various deletion fragments of intron 1 were finely dissected and fused with upstream -2937/-1 and GFP [(-2937/-1)/GFP]. The somite-specific expression rates were 2, 90, 88, 87, 83, 12, 10, 8 and 83 % for embryos injected with (-2937/-1)/GFP fused with intron 1 +502/+2503,

+1174/+2503, +1768/+2503, +790/+1489, +1467/+2152, +502/+1787, +502/+1199, +502/+835 and +502/+659, respectively. Whereas, the somite-specific expression rate of embryos injected with (-2937/-1)/GFP was 84 %, which was quite close (91 %) to that of embryos injected with fragment (-2937/-1)/GFP/(+502/+1199) but absence of +660/+816 segment. These evidences strongly suggest that downstream sequence of +660/+816 motif represses the expression of zebrafish *myf-5* gene. This is the first report to propose that an intron segment may be involved in delicately controlling the somite-specific and stage-dependent expression of *myf-5*.

關鍵詞(keyword)

intron, *myf-5*, regulatory *cis*-elements, repression, somite

報告內容

一、前言與研究目的：

脊椎動物骨骼肌發育起源來自體節 (somite)，由paraxial mesoderm經由環節分裂 (segmentation)產生。體節內的肌肉前驅細胞 (myogenic precursor cell) 亦稱為肌原母細胞(myoblast) 受到鄰近組織如神經管 (neural tube)、脊索 (notochord)、floor plate及背側與軸測外胚層發散出之訊號共同誘導形成 (Ordahl and Le Douarin, 1992; Münsterberg et al., 1995; Denetclaw et al., 1997)。隨著dermomyotome的形成並向身體頭尾延伸，鄰近中軸的肌原母細胞未來轉變稱為軸上生肌節 (epaxial myotome)；遠離中軸，鄰近腹側的肌原母細胞未來轉變稱為軸下生肌節 (hypaxial myotome)；而位於兩者中間的細胞，背側則轉變成為皮原節 (dermatome)，腹側則轉變稱為骨原節 (sclerotome)。軸上生肌節主要參予背側deep muscle的生成；軸下生肌節主要分化產生骨骼肌以及四肢；骨原節則分化產生脊椎與肋骨的軟骨組織；皮原節形成背部表皮的真皮組織 (Ordahl, 1993; Christ and Ordahl, 1995; Kato and Anyama, 1998; Venters et al., 1999)。在高等脊椎動物中，骨骼肌主要是由軸下肌形成，而軸下肌又可進一步區分為形成體幹肌肉的非遷移性軸下肌 (Non-migratory hypaxial muscle)與形成四肢、舌肌及咽喉部分的遷移性軸下肌 (migratory hypaxial muscle) (Christ et al., 1983; Bober et al., 1991; Pownall and Emerson, 1992; Smith et al., 1994; Williams and Ordahl, 1994; Denetclaw et al., 1997)。

肌肉發育過程中，細胞命運的決定與肌肉的分化，主要受到一群肌肉特異性轉錄因子的調控，因此統稱為muscle regulatory factors (MRFs)。目前發現的MRFs主要由四成員組成，分別稱為MyoD (Davies et al., 1987)、Myf5 (Braun et al., 1989)、Myogenin (Braun et al., 1989; Wright et al., 1989; Edmondson and Olson, 1990)及MRF4 (Rhodes and Konieczny, 1989; Braun et al., 1990; Miner and Wold, 1990)。MRFs結構中具有一個basic-DNA binding motif

與helix-loop-helix domain，此種特徵亦被發現於生物體的其他蛋白質中，如 protooncogene c-myc (Stone et al., 1987)，調控中胚層形成的Twist (Thisse et al., 1988)與參與果蠅神經生合成的 *achaete-seute* (Villares and Cabrera, 1987)等。MRFs藉由helix-loop-helix domain結構與其他的轉錄因子如E12或E47進行 dimerization，再利用basic-DNA binding motif，專一的與E-box (CANNTG) 結合，而E-box通常存在於肌肉發育相關基因的上游調控區域，進而達到活化肌肉特異性基因表現之功能 (Yutzey et al., 1990; Chakraborty et al., 1992; Edmonson and Olson, 1993)。

目前發現，Myf-5、MyoD 被視為調控早期肌肉細胞命運決定之轉錄因子，而 Myogenin 與 MRF4 則負責調控肌肉的分化。體節中的細胞首先表現 Myf-5 與 MyoD，促使肌原母細胞分化成肌原細胞 (myocyte)，之後細胞再表現 Myogenin 與 MRF4，使單核的 myocyte 融合得以繼續分化並伸長成多核的肌管 (myotube)，進一步形成肌肉纖維 (muscle fibers) (Smith et al., 1994; Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994; Rudnicki and Jaenisch, 1995; Cornelison and Wold, 1997)。在高等脊椎動物肌肉發育的過程中，MRFs 的表現受體節周圍組織訊息影響 (Currie and Ingham, 1998; Cossu and Borello, 1999)。Myf-5 的表現受神經管 (neural tube)與脊索 (notochord)產生的訊息因子包括 hedgehog 及 Wnt 1 誘導而開始產生 (Miller et al., 1999; Borycki et al., 1999; Kruger et al., 2001; Gustafsson et al., 2002)。MyoD 的表現受體節外側的 Wnt 7 (Cossu et al., 1996; Cossu and Borello, 1999; Ridgeway et al., 2000; Wagner et al., 2000; Cauthen et al., 2001)所誘導產生，而 TGF- β superfamily 成員 BMP4 (bone morphogenic protein 4)的參與，避免 MyoD 的過早產生造成體節提前分化 (Cossu et al., 1996; Cossu and Borello, 1999; Dietrich 1999)。

目前斑馬魚 myf-5 基因的研究，利用 whole mount *in situ* hybridization 偵測斑馬魚 myf-5 基因的 mRNA，其在 7.5 hours post fertilization (hpf)開始出現，之後以每小時持續增加兩對 somite 表現 myf-5 mRNA，而其表現量在 16 hpf 時達到最高峰，此時約有 12 對的 somite 表現，之後 myf-5 mRNA 的表現量逐漸減弱，到 26 hpf 之後完全偵測不到 (Chen et al., 2001)。但是對於 myf-5 基因的調控機制仍不清楚，目前文獻中只能了解老鼠 myf-5 基因表現所必需的 cis-acting elements 位在其上游 96 kb 範圍之內 (Hadchouel et al., 2000)；另外，進一步以比較方式，大範圍定義出其上游 140 kb 調控區內，可能調控老鼠 myf-5 基因在軸上肌、軸下肌、中樞神經、尾部肌肉和 branch arch 等處表現的 cis-acting element 區域，(Summerbell et al., 2000； Carvajal et al., 2001)。斑馬魚 myf-5 研究方面，目前定義出上游-82 到-1 核苷酸序列為一個 minimal cis-acting element (Chen et al., 2001)，且-82 到-62 核苷酸序列對 myf-5 體節專一表現是相當重要的 (Chen et al., 2003)。

由此得知，我們對斑馬魚 myf-5 基因的了解仍相當有限，因此，為更了解 zebrafish myf-5 基因組織及時期專一表現特性的調控機制，本文著重在

myf-5 基因更上游片段，*myf-5* intron 片段及 *myf-5* 3'-UTR 片段等，對 *myf-5* 基因組織及時期專一表現的影響。也就是運用顯微注射方式，快速地在 *in vivo* 方式下分析，找出 *myf-5* 基因中，可能具有調控能力的結合位置，藉此結合位置，進而了解 *myf-5* 基因與其他基因間之相互關係，使 *myf-5* 基因在胚胎肌肉發育中的角色及複雜的調控機制能更加清楚。

二、研究方法：

質體構築

為了瞭解斑馬魚 *myf-5* 的 first intron 在基因調控上扮演的角色，本實驗設計了各種不同的引子組合(附錄一)，目前總共構築 31 個表現質體。

In Vivo Transgenic Assay

A. 斑馬魚 (AB strain) 之飼養：

野生種斑馬魚，個體成長至兩個月時，即訓養在 28.5 °C、光/暗週期分別 14/10 小時的恆溫培養箱中，雄、雌成魚比例為 2 : 3，約 40 尾，飼養於 60 cm × 20 cm × 30 cm 的玻璃水族箱中，以適量的人工乾燥飼料與豐年蝦餵之。

B. 受精卵的收集：

顯微注射前一天，晚間 11 點，在恆溫箱即將進入暗週期前，將魚集中於寵物箱中，以隔離網隔離，於隔日早上光週期開始後，每隔 15~20 分鐘收集一次魚卵。每次約可注射 30~40 顆魚卵，一次實驗可注射 250~300 顆左右的卵。

C. 顯微注射實驗：

I. 注射用 DNA 之製備：

將欲注射之 DNA 以限制酵素作用，線性化後，回收 DNA，純化過後的 DNA 溶於適量的無菌水中，以分光光度計進行定量 (GeneQuant II, RNA/DNA Calculator) (Pharmacia Biotech)。本實驗進行顯微注射濃度皆為 25ng/μl。

II. 顯微注射：

將線性化及定量完成之 DNA 與含 5 x PBS 之 phenol red 稀釋混合至所需注射濃度，DNA 則利用 zebrafish microinjector (Drummond) 吸入毛細管中，注射之毛細管直徑開口為 10~15 μm，以毛細管插入一細胞時期之動物極中，並將 DNA 注入，所注入的 DNA 量約為 2.3 nl。

III. 受精卵的培育：

將注射過的受精卵以滅菌水清洗，之後放在 28.5 °C 恆溫箱培養，之後依斑馬魚胚胎生長發育圖(附錄二)進行連續觀察。

IV. 觀察綠螢光表現情形及記錄其表現率、存活率：

將注射後之胚胎置於盛有少量水的培養皿中，在螢光顯微鏡（顯微鏡：Leica MZ-12；螢光系統：燈源 Hg 100 W、filter set GFP-Plus；照相裝置：MPS 60）下，觀察綠螢光表現及分布情形。

於 5 hpf 開始觀察其綠螢光表現，之後進行連續性觀察，在 30 hpf 時，觀察綠螢光表現在 somite 部位稱為 somite-specific expression，綠螢光表現在 somite 外的其他部位，如：卵黃、皮膚等 non-specific expression 稱為 ectopic expression。將 somite specific expression 的胚胎數除以總存活胚胎數，所獲得到數值定義為 specific expression rate（專一表現率）。觀察後並拍照，計算其存活率及表現率。另外取未注射 DNA 的卵作為對照組，於 30 hpf 時計算其存活率。

RT-PCR

取特定時期之斑馬魚胚胎約 100 顆，加入 500 µl 之 TRI reagent，以組織研磨器將胚胎打碎，接著加入 100 µl 之 CHCl₃，室溫下以旋轉混合方式作用 15 分鐘，混合均勻後，4 °C，7500 Xg，離心 30 分鐘。將上清液吸至另一離心管中，加入 0.6 倍吸出體積之 Isopropanol，置於 -20 °C 沉澱 1 小時以上。將沉澱之 RNA 取出，4 °C，14000 Xg，離心 30 分鐘，倒去上清液。加入 70 % EtOH 進行洗鹽，4 °C，14000 Xg，離心 5 分鐘，將 RNA 溶於 100 µl 水中。加入 2 µl DNaseI，37 °C，作用 30 分鐘，再以 70 °C，作用 15 分鐘。取 15 µl RNA (2 µg)，加入 1 µl Oligo dT primer，先在 70 °C，作用 15 分鐘。將 5 X M-MLV RT buffer，10 mM dNTP，rRNasin，M-MLV RT，依體積比例加入，在未加入 M-MLV RT 前，先在 42 °C，作用 10 分鐘，再加入 M-MLV RT，42 °C，作用 1 小時，再以 70 °C，作用 15 分鐘。加入 1 µl RNaseH，37 °C，作用 30 分鐘，再以 70 °C，作用 15 分鐘。接下來即以此 cDNA 為模板進行 PCR 實驗。

三、結果：

Zebrafish *myf-5* 基因不同大小上游調控序列連接綠螢光蛋白，對體節專一表現之分析：

為了解 zebrafish *myf-5* 時間及時期專一表現的特性，因此設法構築含有更長 *myf-5* 上游啟動子之質體，希望在更長 *myf-5* 上游序列中，能包含更多 *myf-5* 的調控因子，更加忠實地呈現 *myf-5* 表現情形。為獲得更上游 *myf-5* 啟動子序列，抽取含有 *myf-5* 序列之 phage DNA，此 DNA 片段中，具有

myf-5 基因上游 10 kb 及下游 3 kb 序列，以接合方式構築出質體 pZmyp (-9977/-1)/GFP 和 pZmyp (-8600/-1)/GFP，在線性化後進行顯微注射，同時注射 pZmyp (-2937/-1)/GFP、pZmyp(-290/-1)/GFP 作為對照組。結果顯示，四種質體 [pZmyp (-9977/-1)/GFP、(-8600/-1)/GFP、(-2937/-1)/GFP、(-290/-1)/GFP] 在 30 hpf 時，觀察綠螢光在體節專一表現率分別為 94 %、96 %、84 % 和 85 %。表示新構築質體中含有之 10 kb、8.6 kb 上游序列，能非常專一啟動綠螢光蛋白在體節表現，而且綠螢光表現強度及綠螢光表現率隨上游序列增加而有上升趨勢 (Fig. 1)。在螢光觀察中亦發現，含有 *myf-5* 基因上游 10 kb 之表現質體，綠螢光在約 6 hpf 時，便在 segmental plate 的位置出現點狀螢光，出現時間較注射含 *myf-5* 基因上游 6 kb 之表現質體 [pZmyp (-6212/-1)/GFP]，在 7.5 hpf 表現更為提早 (Chen *et al.*, 2001)。螢光表現狀態與 whole mount *in situ* hybridization 所偵測內生性 *myf-5* mRNA 表現之位置非常類似，但是螢光持續表現超過 48 hpf，並無減弱跡象。

Zebrafish *myf-5* 上游調控序列接合部分下游結構基因序列，對體節專一表現的分析：

因此，為試圖探討 *myf-5* 基因下游序列中，是否具有調控 *myf-5* 在 16 hpf 後，造成 mRNA 表現程度減弱的相關序列存在，進而構築以下含有 *myf-5* 上游調控序列，接合部分下游結構基因序列之質體，顯微注射觀察其表現率及表現位置的差異。構築表現的質體中，含有四種不同長度 zebrafish *myf-5* 上游序列(-9977/-1, -8600/-1, -2937/-1, -290/-1)，連接 zebrafish *myf-5* exon 1 (E1)、intron 1 (I1)、exon 2 (E2)，再 in frame 接合 GFP cDNA (GFP)，進行顯微注射。結果發現，四質體 pZmyp (-9977/-1)/E1/I1/E2/GFP~(-290/-1)/E1/I1/E2/GFP 螢光在體節專一表現率分別下降到 2 %、1 %、5 % 和 4 %，且綠螢光表現強度非常微弱，螢光大部分呈點狀，表現位置多靠近中軸的深層體節中，鮮少觀察到棒狀、紡錘狀螢光出現 (Fig. 1)。為了證實不會因 intron 1 沒有被正確 splicing，使得 mRNA 在轉譯 (translation) 過程發生 reading shift 的情形，造成綠螢光表現程度降低。因此，進一步設計引子，收集顯微注射外來基因片段 pZmyp (-9977/-1)/E1/I1/E2/GFP 後，發育至 24 hpf 之斑馬魚胚胎，並以未注射之野生種胚胎作為對照組，進行 RT-PCR 實驗。結果顯示，僅在實驗組中能被專一引子夾出 DNA 片段，且此 DNA 片段符合 intron 1 被 splicing 後 mRNA 片段大小，證明 intron 1 確實被正確 splicing (Fig. 2)，因此觀察到的綠螢光的確是 Myf-5 與 GFP 之 fusion protein，但螢光表現程度下降許多，極可能是因為 *myf-5* 基因下游序列中，存在著重要的調控因子，調控 *myf-5* 基因的表現。

不同長度 zebrafish *myf-5* intron 1 片段與上游序列和 GFP 相連後，對體節專一表現的分析：

myf-5 基因下游序列的增加，造成綠螢光表現率的降低，因此將 *myf-5* 上游序列 (-2937/-1) 與 GFP cDNA (GFP) 相接之後，再接上 intron 1 (+502/+2503) 完整片段，或者分別接上十個運用連續性剔除造成的不同長度 intron 1 片段，所構築的質體，進行顯微注射(Fig. 3)。結果中發現，*myf-5* 上游序列與 GFP 相接，再接上完整的 intron 1 片段之 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(+502/+2503)，顯微注射後，螢光表現率只有為 2%，較未接上 intron 1 片段的 pZmyp(-2937/-1)/GFP 質體 84% 表現率下降非常顯著。若轉殖以另一相同大小 2 kb DNA 片段取代 intron 1 位置所構築的質體 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(λ2K)，其螢光表現率卻為 87% 與 pZmyp(-2937/-1)/GFP 差異並不多。顯示 intron 1 片段中，含有會造成 *myf-5* 在體節表現率下降的調控區域。接著用連續性剔除造成不同長度的 intron 1 片段，接連到 pZmyp (-2937/-1)/GFP。當含有 intron 1 片段+502/+835 所構築質體 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(+502/+835)，顯微注射螢光表現率仍然相當低僅 8%，進一步縮減 intron 1 片段，保留+502/+659，構築質體 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(+502/+659)，螢光表現率卻回復至 83%。若用限制酵素限制酵素 *HindIII*、*XbaI* 切去 *myf-5* +660/+816 序列而構築質體 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(+502/+1199)Δ(+660/+816)，螢光表現率也回復至 91%。綜合上述結果，推測造成表現率下降的調控區域，可能位在 intron 1 片段+660/+816 中。

Zebrafish *myf-5* 基因 intron 1 序列(含+660/+816 區域)，其方向性與位置性對螢光表現之影響：

構築質體之中若更改 intron 1 中+660/+816 序列的方向性，其轉殖胚胎的螢光表現率差異相當大 (Fig. 4)，如 intron 序列(含+660/+816 區域)以正向方式接入之質體 pZmyp (-2937/-1)/GFP/(+502/+2503) 及 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(+502/+835)，其螢光表現率分別僅為 2% 及 8%；但若相同序列卻反向接入，構築之質體 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(+2503/+502) 與 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(+835/+502)，其螢光表現率卻可恢復至 82% 及 86%。而選用 λ*HindIII* marker 2kb 片段(λ2K)取代 intron 1 的序列所構築之正向質體 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(λ2K)(+) 與反向質體 pZmyp(-2937/-1)/GFP/(λ2K)(-)，其螢光表現率完全不受正反向接入的影響，維持 89% 及 82%。另外，若將 intron 序列(含+660/+816)正向接至啟動子之前，構築質體 pZmyp (+502/+1199)/(-2937/-1)/GFP，顯微注射螢光表現率 75%。綜合上述證據發現，zebrafish *myf-5* 基因的 intron +660/+816 序列對 *myf-5* 基因的表現，是具有方向及位置專一特性的。

四、討論：

斑馬魚 *myf-5* 上游 10 kb 啟動子序列、3' UTR 區域與 intron 1 片段+660/+816 抑制 *myf-5* 表現的相互關係：

本文初步結果證實，抑制斑馬魚 *myf-5* 表現率下降的調控區域，可能位在 intron 1 片段+660/+816 序列中。但由實驗數據觀察發現，推論藉由結合 +660/+816 序列，達到 *myf-5* 表現率下降的調控機制，與 *myf-5* 上游 10 kb 啟動子序列，並無直接影響作用 (Fig. 1)。因為四種不同長度斑馬魚 *myf-5* 上游序列 (-9977/-1, -8600/-1, -2937/-1, -290/-1)，連接部分下游結構基因序列(E1/I1/E2)，進行顯微注射，體節專一螢光表現率並無隨著上游序列的增加而有所改變，皆維持在 2~5% 間(Fig. 1)。因此，此片段在調控 *myf-5* 表現的主要功能並不在於此。然而在僅含有上游 10 kb 啟動子序列，即不含 E1/I1/E2 的表現質體 pZmyp (-9977/-1)/GFP，經顯微注射發現綠螢光在約 6 hpf 時，便在 segmental plate 的位置出現點狀螢光，出現時間及螢光表現狀態，與 whole mount *in situ* hybridization 所偵測內生性 *myf-5* mRNA 表現之位置非常類似 (Fig. 1)，而且體節專一螢光表現率相當高，顯示在較長 *myf-5* 上游序列中，確實包含了更多 *myf-5* 的調控因子，能更忠實地呈現 *myf-5* 在胚胎早期的表現。然而，斑馬魚 *myf-5* 上游 10 kb 調控區域，雖然具有忠實呈現 *myf-5* 在胚胎早期表現的功能，但是螢光表現卻在 16hpf 之後不受抑制反而持續表現；而只要 *myf-5* 上游 10 kb 序列，與部分下游結構基因序列(E1/I1/E2) 連接，在胚胎發育過程中，螢光表現率始終很低且螢光強度微弱。推論 zebrafish *myf-5* 在 10 kb 更上游序列中，可能存在著與 intron 1 片段+660/+816 相互合作調控的機制，使 *myf-5* 在胚胎發育 16hpf 之前，不受 intron 1 片段+660/+816 抑制作用影響。

myf-5 intron 1 片段+660/+816，方向及位置專一特性的探討：

myf-5 intron 1 片段+660/+816，造成 *myf-5* 表現率下降的能力是具有方向及位置專一的特性。*myf-5* intron 1 片段+660/+816 序列擁有此二特色，可能 intron 1 片段+660/+816 序列形成特殊的二級結構造成基因轉錄(transcription) 不易；或者 intron 1 片段+660/+816 序列在特定時期，結合特殊蛋白質，造成轉錄過程空間的阻礙。因為在 RNA 轉錄過程中，只有 exon、intron 有機會被轉錄出序列，如 intron 1 片段+660/+816 序列在轉錄過程造成抑制，將其移至啟動子序列之前勢必失去其抑制功能；RNA 轉錄過程，RNA polymerase 由 5 端往 3 端方向前進，intron 1 片段+660/+816 結合特殊蛋白質造成轉錄過程空間的阻礙，如 intron 1 片段方向更改，造成的空間阻礙不同，因此失去抑制作用 (Fig. 4)，或者 intron 1 片段 +660/+816 必須與三度空間鄰近序列區域如 exon 1 共同作用，若更改 intron 1 片段方向及位置便喪失共同抑制功能。此種現象在 human *Pax5* exon 1A 中所發現之 repressor (Rahman et al., 2001)，與 rat carnitine palmitoyltransferase 1 β first exon/intron 交界之 enhancer (Wang et al., 2002) 也被探討到，皆是具有方向及位置專一特性的。而其他絕大部分基

因 *cis*-acting elements 的調控，此二特徵則較少同時發生 (Klamut et al., 1996; Tone et al., 1999; Outram et al., 2001)。

五、參考資料：

- Bober, E., Lyons, G. E., Braun, T., Cossu, G., Buckingham, M. and Arnold, H. H. (1991). The muscle regulatory gene, Myf-5 has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell. Biol.* **113**, 1255-1265.
- Borycki, A. G., Brunk, B., Tajbakhsh, S., Buckingham, M., Chiang, C. and Emerson, C. P. Jr. (1999). Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development* **126**, 4053-4063.
- Braun, T., Bober, E., Winter, B., Rosenthal, N. and Arnold, H. H. (1990). Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* **9**, 821-831.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. and Arnold, H. H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* **8**, 701-709.
- Carvajal, J. J., Cox, D., Summerbell, D. and Rigby, P. W. (2001). A BAC transgenic analysis of the Mrf4/Myf5 locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. *Development* **128**, 1857-1868.
- Cauthen, C. A., Berdough, E., Sandler, J. and Burrus, L. W. (2001). Comparative analysis of the expression patterns of Wnts and Frizzleds during early myogenesis in chick embryos. *Mech. Dev.* **104**, 133-138.
- Chakraborty, T., Martin, J. F. and Olson, E. N. (1992). Analysis of the oligomerization of myogenin and E2A products in vivo using a two-hybrid assay system. *J. Biol. Chem.* **267**, 17498-17501.
- Chen, Y. H., Lee, W. C., Liu, C. F. and Tsai, H. J. (2001). Molecular structure, dynamic expression, and promoter analysis of zebrafish (*Danio rerio*) *myf-5* gene. *Genesis* **29**, 22-35.
- Chen, Y. H., Lee, H. C., Liu, C. F., Lin, C. Y. and Tsai, H. J. (2003). Novel regulatory sequence -82/-62 functions as a key element to drive the somite-specificity of zebrafish *myf-5*. *Dev. Dyn.* **228**, 41-50.
- Christ, B., Jacob, M. and Jacob, H. J. (1983). On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. *Anat. Embryol.* **166**, 87-101.
- Christ, B. and Ordahl, C. P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat. Embryol.* **191**, 381-396.
- Cornelison, D. D. W. and Wold, B. J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* **191**, 270-283.
- Cossu, G. and Borello, U. (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* **18**, 6867-6872.
- Cossu, G., Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (1996). How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet.* **12**, 218-223.
- Currie, P. D. and Ingham, P. W. (1998). The generation and interpretation of positional information within the vertebrate myotome. *Mech. Dev.* **76**, 3-21.
- Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
- Denetclaw, W. F., Christ, B. and Ordahl, C. P. (1997). Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development* **124**, 1601-1610.
- Dietrich, S. (1999). Regulation of hypaxial muscle development. *Cell Tissue Res.* **296**, 175-182.

- Edmondson, D. G. and Olson, E. N.** (1990). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* **3**, 628-640.
- Edmondson, D. G. and Olson, E. N.** (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Biol. Chem.* **268**, 755-758.
- Gustafsson, M. K., Pan, H., Pinney, D. F., Liu, Y., Lewandowski, A., Epstein, D. J. and Emerson, C. P. Jr.** (2002). Myf-5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gil regulation for muscle specification. *Genes Dev.* **16**, 114-126.
- Hadchouel, J., Tajbakhsh, S., Primig, M., Chang, T. H-T., Dubas, P., Rocancourt, D. and Buckingham, M.** (2000). Modular long-range regulation of Myf-5 reveals unexpected heterogeneity between skeletal muscles in the mouse embryo. *Development* **127**, 4455-4467.
- Kato, N. and Anyama, H.** (1998). Dermamyotomal origin of the ribs as revealed by extirpation and transplantation experiments in chick and quail embryos. *Development* **125**, 3437-3443.
- Klamut, H. J., Bosnoyan-Collins, L. O., Worton, R. G., Ray, P. N. and Davis, H. L.** (1996). Identification of a transcriptional enhancer within muscle intron 1 of the human dystrophin gene. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1599-1606
- Kruger, M., Mennerich, D., Fees, S., Schafer, R., Mundlos, S. and Braun, T.** (2001). Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development* **128**, 743-752.
- Miller, J. B., Schaefer, L. and Dominov, J. A.** (1999). Seeking muscle stem cells. *Curr. Top Dev. Biol.* **43**, 191-219.
- Miner, J. H. and Wold, B.** (1990). Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1089-1093.
- Müller, F., Chang, B. E., Albert, N., Tora, L. and Strähle, U.** (1999). Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord. *Development* **126**, 2103-2116.
- Münsterberg, A. E., Kitajewski, J., Bumcrot, D. A., McMahon, A. P. and Lassar, A. B.** (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* **9**, 2911-2922.
- Ordahl, C. P. and Le Douarin, N. M.** (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* **114**, 339-353.
- Outram, S. V., Grimwade, D. and Crompton, T.** (2001). Repression of CD2 gene expression is mediated by an AP-2 regulated factor. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **281**, 409-415
- Pownall, M. E. and Emerson, C. P.** (1992). Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. *Dev. Biol.* **151**, 67-79.
- Rahman, M., Hirabayashi, Y., Ishii, T., Kodera, T., Watanabe, M., Takasawa, N. and Sasaki, T.** (2001). A repressor element in the 5'-untranslated region of human Pax 5 exon 1A. *Gene* **263**, 59-66.
- Rhodes, S. J. and Konieczny, S. F.** (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* **3**, 2050-2061.
- Ridgeway, A. G., Petropoulos, H., Wilton, S. and Skerjanc, I. S.** (2000). Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin. *J. Biol. Chem.* **275**, 32398-32405.
- Rudnicki, M. A. and Jaenisch, R.** (1995). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *BioEssays* **17**, 203-209.
- Smith, T. H., Kachinsky, A. M. and Miller, J. B.** (1994). Somite subdomains, muscle cell origins, and the four muscle regulatory factor proteins. *J. Cell Biol.* **127**, 95-105.

- Stone, J., de Lange, T., Ransay, G. et al.** (1987). Definition of regions in human *c-myc* that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1697-1709.
- Summerbell, D., Ashby, P. R., Coutelle, O., Cox, D., Yee, S-P. and Rigby, P. W. J.** (2000). The expression of *myf-5* in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. *Development* **127**, 3745-3757.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C., Perrin-Schmitt, C.** (1988). Sequence of the *twist* gene and nucleolar localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J.* **7**, 2175-2183.
- Tone, Masahide., Diamond, L. E., Walsh, L. A., Tone, Y., Thompson, S. A. J., Shanahan, E. M., Logan, J. S. and Waldmann, H.** (1999). High level transcription of the complement regulatory protein CD59 requires an enhancer located in intron 1. *J. Biol. Chem.* **274**, 710-716.
- Venters, S. J., Thorsteinsdottir, S. and Duxson, M. J.** (1999). Early development of the myotome in the mouse. *Dev. Dynam.* **216**, 219-232.
- Villares, R. and Cabrera, C. V.** (1987). The *achaete-scute* gene complex of *D. megalomaster*: conserved domain in subset of gene required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell* **50**, 415-424.
- Wang, G. L., Moore, M. L. and Mcmillim, J. B.** (2002). A region in the first exon/intron of rat carnitine palmitoyltransferase 1 β is involved in enhancement of basal transcription. *Biochem. J.* **362**, 609-618.
- Wagner, J., Schmidt, C., Nikowits, W. Jr. and Christ, B.** (2000). Compartmentalization of the somite and myogenesis in chick embryos are influenced by *wnt* expression. *Dev. Biol.* **228**, 86-94.
- Williams, B. A. and Ordahl, C. P.** (1994). Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* **12**, 785-796.
- Wright, W. E., Sassoon, D. and Lin, V. K.** (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**, 607-617.
- Yablonka-Reuveni, Z. and Rivera, A.** (1994). Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev. Biol.* **164**, 588-603.
- Yutzey, K. E., Rhodes, S. J. and Konieczny, S. F.** (1990). Differential trans activation associated with the muscle regulatory factors MyoD1, myogenin, and MRF4. *Mol. Cell Biol.* **10**, 3934-3944.

附錄一：本實驗使用之引子其名稱及序列如下(由生工公司合成)

G0.3-SacIF	CGCGAGCTCTCAAAGTCTACATCTAAA
G0.3-AgeIR	GGTGGCGACCGGTACAGGACTGTTGCA
F1	ATGGTAAATATGACTCTCTTTCTCT
F2	TCTATGGGGTTTTAAACATGATAGAC
F3	CTACAGTGAAGCTCTGCATAAACTC
F4	GGCTCCTCCTTTTACGCTTAGATA
F5	TGTTCAATCACTCATTTTCTTTTCG
F6	TTAAATGACTACAATACTGTTGG
F7	GACTCTAAAAAATGCTGGAT
R1	GACACAATGAAGAAGAGAGAAACCT
R2	TATATATCTAAGCGTAAAAG
R3	TGGACAAACAGCAGTAAGC
R4	CGAAAAGAAAATGAGTGAATGAACA
R5	CCAACAGTATTGTAGTCATTTAA
R6	ATCCAGCATTTTTTAGAGTC
R7	GATTTACTGAGGCTTTATTGGGC
R8	GCAGTCAACCTACAATGACAAA
Primer 1	TCAGGAGCTCCTCAGGGAACAAGTG
Primer 2	ACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA

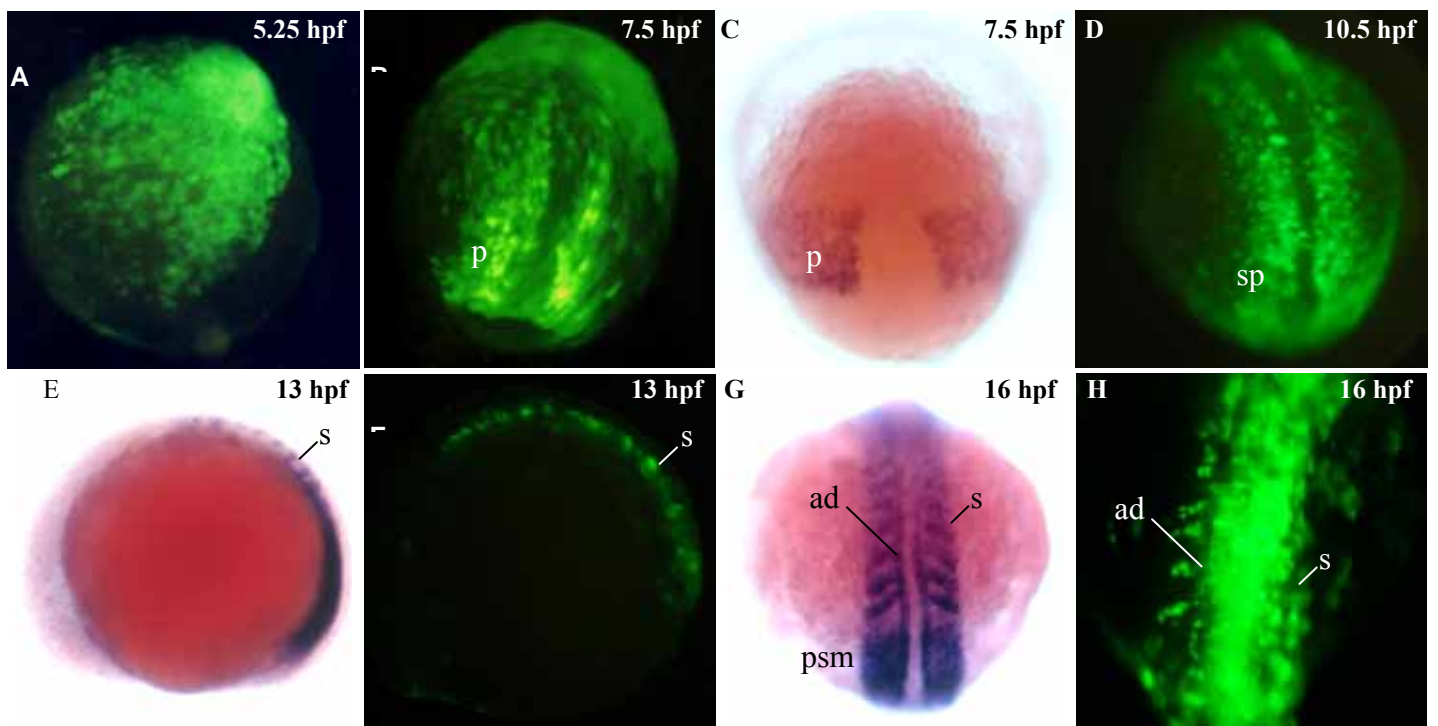
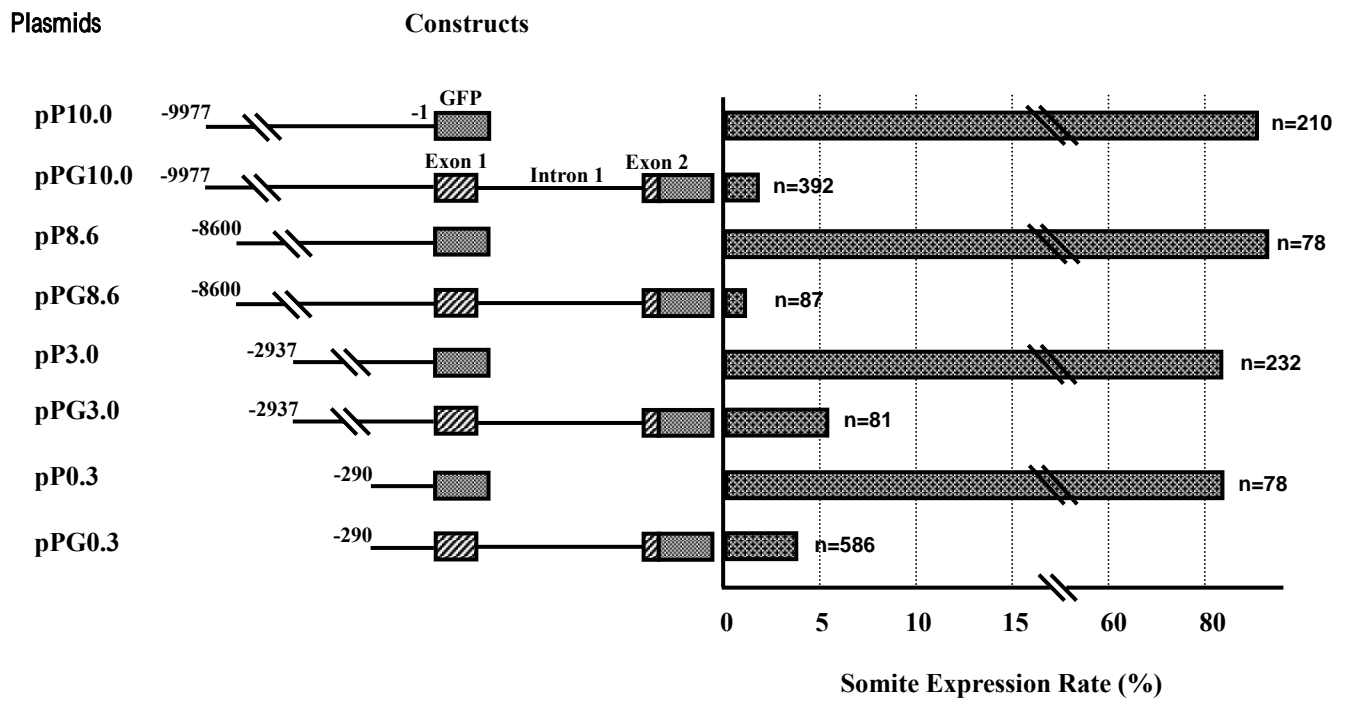


Fig. 1

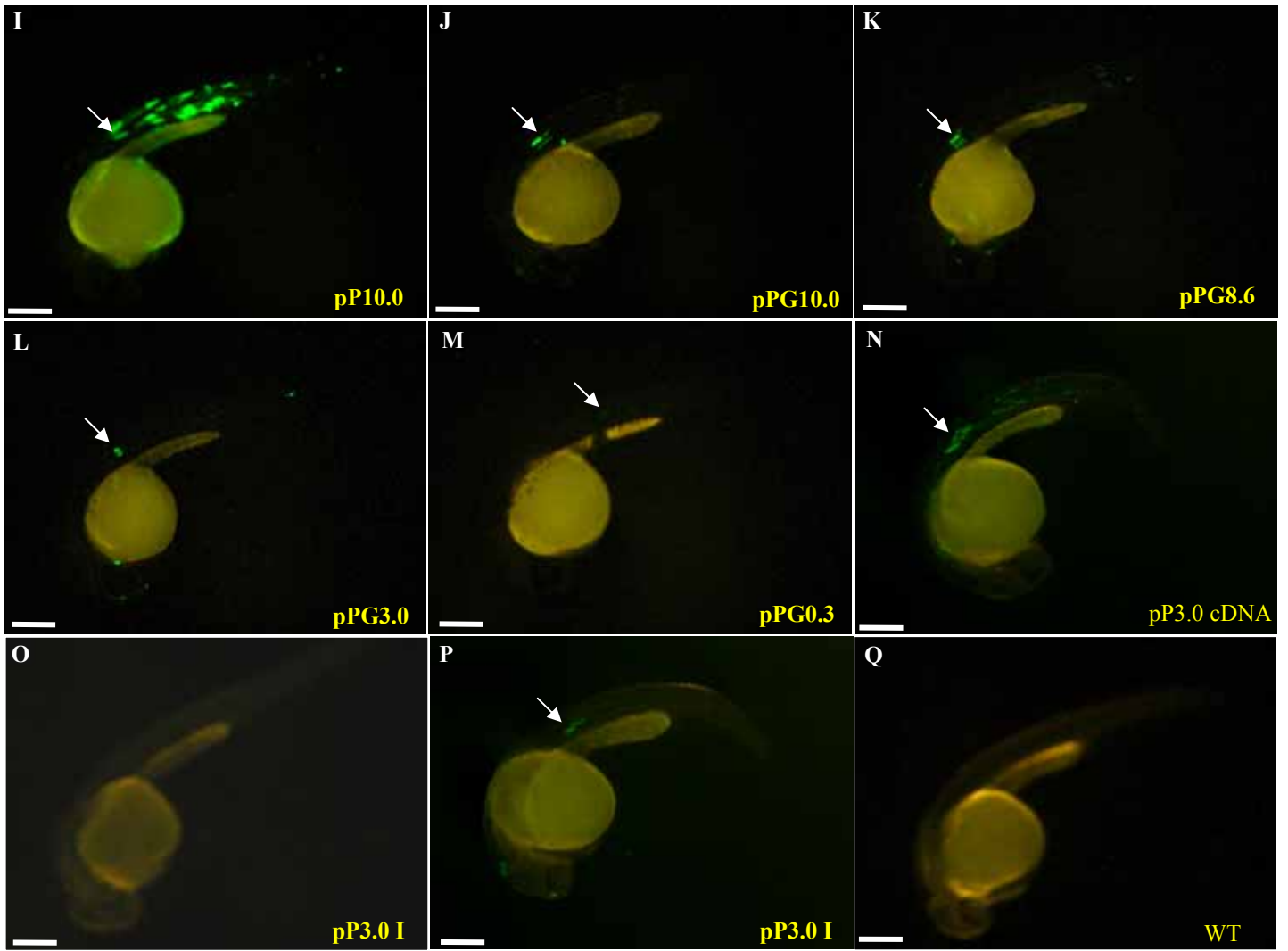


Fig. 1. (continued)

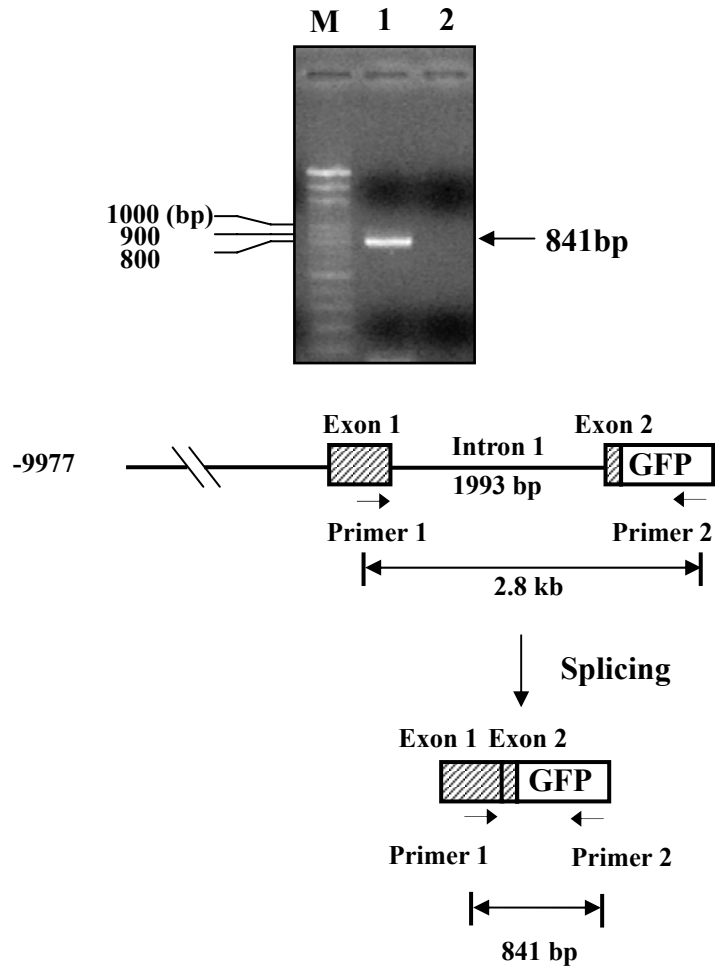


Fig. 2.

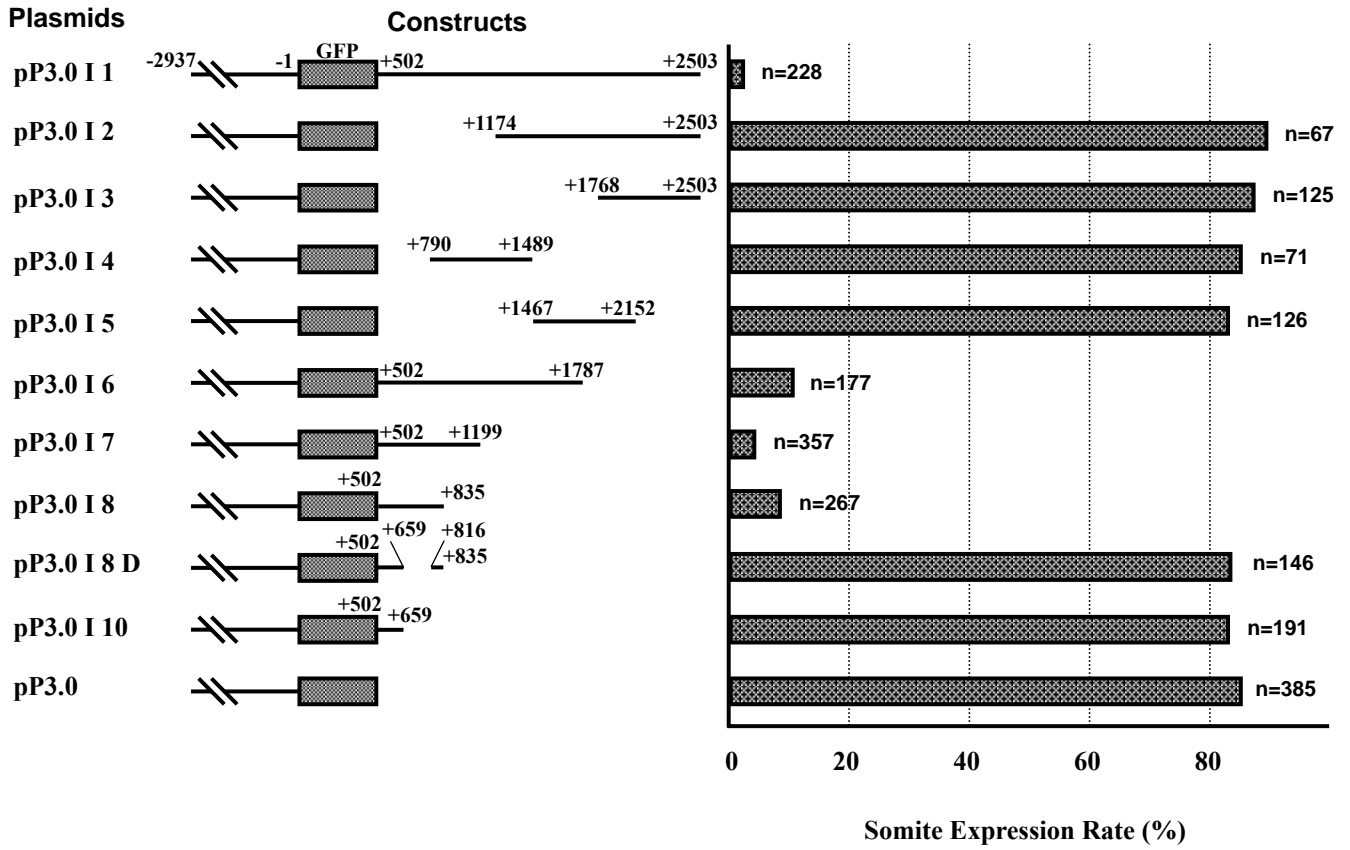


Fig. 3.

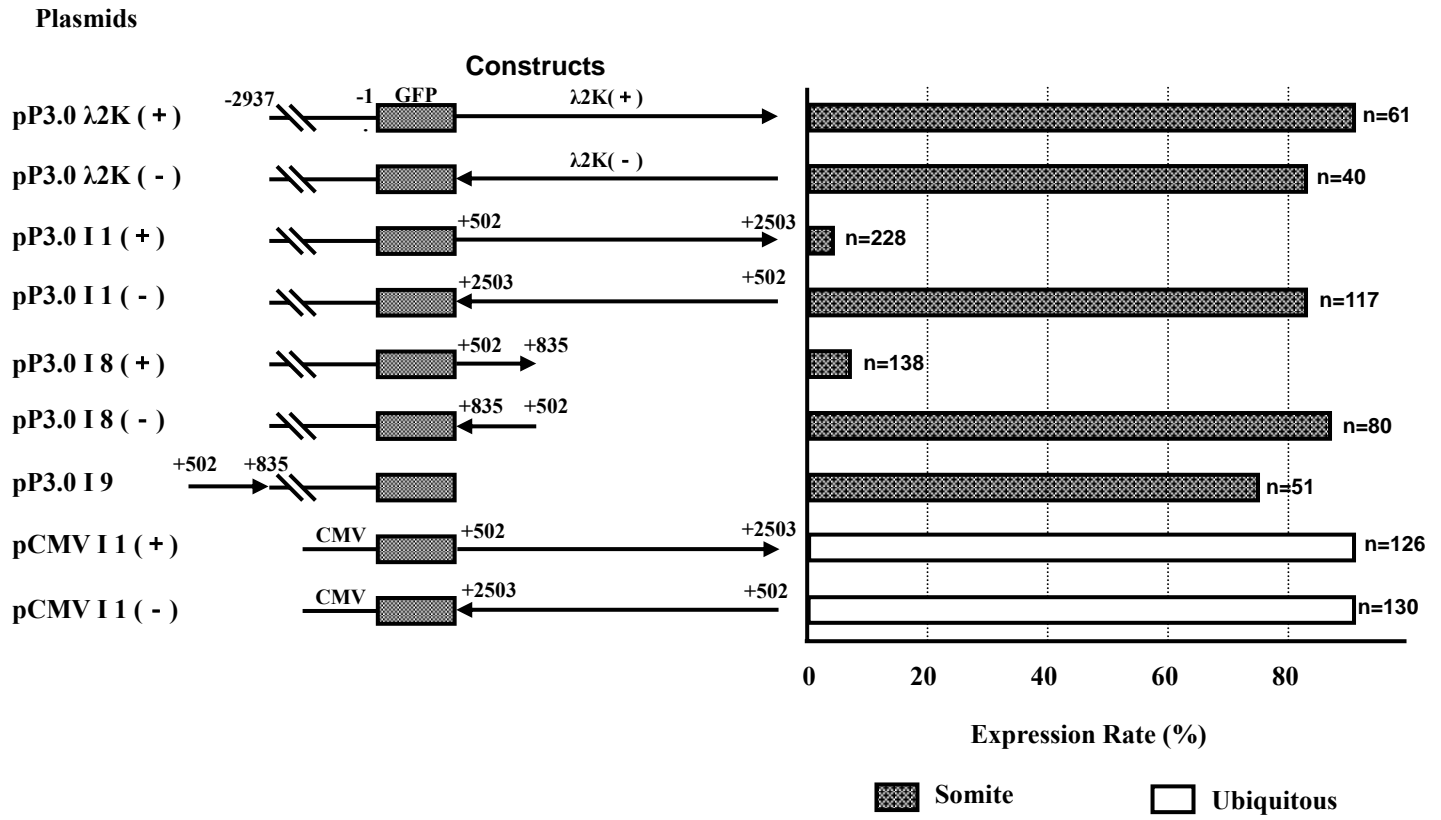


Fig. 4.