

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

斑馬魚控制心血管系統發育基因的研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2314 - B002 - 568

執行期間： 89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人： 謝 豐 舟

共同主持人： 李 建 南

協同研究人員： 吳 金 洌

張 繼 堯

鄭 文 芳

龔 政 哲

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台灣大學醫學院婦產科

中 華 民 國 90 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：斑馬魚控制心血管系統發育基因的研究

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-568

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：謝豐舟

執行機構及單位名稱：台灣大學醫學院婦產科

一、中文摘要

心臟是一個非常重要的器官，在國人新生兒中，先天性心臟病的病例便超過了0.8%。在胚胎發育的過程中心臟是很早發育、行使功能的器官，同時也很容易觀察。較早的脊椎動物研究多以老鼠為材料，但是胎生的老鼠在研究的過程中往往受到相當多的限制。然而近幾年斑馬魚 (*Danio rerio*) 逐漸成為脊椎動物研究的一個模式系統，因此我們希望以斑馬魚建立起一個研究心血管系統發育的模式動物，設計一個三年度的研究計畫，本計畫具有以下的目的：(1) 研究斑馬魚胚胎時期控制心血管系統發育的基因功能；(2) 研究人類控制心血管系統發育的基因功能；(3) 探討先天性心臟病病例中這些基因的表達情形；(4) 研究控制心臟發育的機轉。在第一、二年的工作首先選殖斑馬魚控制胚胎心血管系統發育的基因 zGATA-4，DNA 序列分析以及 *in situ* hybridization 顯示該基因含 DNA-binding domain 以及在心臟與消化道表達；第三年則將繼續分析其生理功能，以及調節該基因表達的機轉，我們針對 GATA-4 transcriptional factor 的特性，構築 gain- or loss- of-function constructs，在細胞內大量表達，分析其細胞生理、型態以及分化發育的變化，希望可以藉以初步解開控制心血管系統發育的分子機轉。

關鍵詞：心血管系統，斑馬魚，胚胎發育，GATA-4

二、英文摘要

Heart is an important organ. In Taiwan, more than 0.8% of neonates have genetic defects in heart. Heart develops and functions early during embryogenesis and is also readily to observe. Earlier vertebrate

studies focused mainly on mouse, however, there were many limitations. In recent years, zebrafish (*Danio rerio*) became a model system of vertebrate. We attempt to investigate the utility of the zebrafish as a vertebrate genetic organism that is particularly suited to screening for mutations that perturb the developing cardiovascular. The object of this project are following: (1) to study genes controlling development of zebrafish cardiovascular system; (2) to study genes controlling development of human cardiovascular system; (3) to investigate the relationship between the expression of these genes and genetic heart defects; (4) to elucidate the mechanisms controlling development of cardiovascular system. In the first two years, we have isolated a GATA-4-like cDNA from zebrafish. DNA sequence analysis and *in situ* hybridization revealed that it contains a DNA-binding domain and is expressed in heart and gut. In the third year, functional studies will be performed. Gain- or loss- of-function constructs are used to transform cells to analyze the changes of the physiology, phenotype or differentiation. The major aim of this project is to elucidate the molecular mechanism controlling the development of vertebrate cardiovascular system.

Keywords : cardiovascular system, *Danio rerio*, embryogenesis, GATA-4

二、緣由與目的

器官的形成是一個非常複雜的過程。儘管自受精卵到完整胚胎各個階段的發育形態都已經相當清楚，可是細胞之間的互動、控制細胞分化的基因表達與作用機轉卻還了解地不多。多細胞動物在發育的階

段中，個別的細胞受到外來環境的影響與 cell lineage 的訊息而決定其分化的狀態，形成迥然不同的結構。例如染色體（尤其是第 13、18 與 21 對）數目的異常會造成先天性畸形；母親年齡大於 35 歲以後，胎兒患有唐氏症的機會也大幅上升等。但是這些外在環境與細胞本身的訊息物質如何控制細胞的分化與器官的形成大多仍屬未知。

由於動物界中胚胎的發育過程都非常相似，而且基因的表達也具有很高的保留度。因此脊椎動物的研究多以無脊椎動物為範本 (Fishman and Stainier, 1994)。控制脊椎動物發育的基因研究早期主要依賴與果蠅突變基因具有同源性的基因的篩選與鑑定 (Granato and Nusslein-Volhard, 1996)。然而，這種研究方法只能針對無脊椎動物與脊椎動物間共通的特性，並無法分析脊椎動物所特有的部分，例如 neural crest 的發育，以及在器官形成或運動方面的差異。脊椎動物所特有的發育形態上的基因篩選鑑定的工作於是就必須在脊椎動物中尋找一個適合的模式動物，參照果蠅的研究程序，尋找控制脊椎動物發育的基因。

較早脊椎動物的研究主要用蟾蜍和老鼠作為對象。這幾年斑馬魚 (*Danio rerio*) 漸漸受到重視。斑馬魚由 Streisinger 等人 (1981) 引用為脊椎動物遺傳研究的系統後，由於斑馬魚的發育極為迅速，受精卵在 12 小時內便可看出脊椎動物的雛型，24 小時內已可觀察到心臟的搏動，兩天後孵化；斑馬魚胚胎從 pre-gastrula、gastrula 到器官形成各個時期的發育形態都很清楚 (Kimmel et al., 1995)，對突變性狀的鑑定奠定了紮實的基礎。斑馬魚的突變誘導也很簡單 (Mullins et al., 1994)，利用伽瑪射線照射或突變劑 *N*-ethyl-*N*-nitrosourea，都可進行大規模的突變篩選，至今已經篩選到 1,500 種以上突變株、已知約有 400 多個基因參與控制發育過程 (Grunwald et al., 1988; Granato and Nusslein-Volhard, 1996; Stainier et al., 1996;)。由於以上的種種優

點，使得斑馬魚已是目前研究脊椎動物發育的最佳模式動物之一。

心臟同時是研究胚胎發育很理想的器官：心臟的結構相當簡單，主要由兩層 epithelial tubes 所組成，內層的 endocardial tube 與外層的 myocardial tube；心臟在胚胎發育的早期便已形成，也是最早行使功能的器官；而且心臟極易觀察，其位置、結構或功能的異常均可藉視覺或聽覺加以辨別。

根據衛生署的統計資料，在民國七十九年間，臺灣地區先天性異常疾病分別位居新生兒及嬰兒死亡原因的第二及第一位，而在活產兒中先天性體表異常佔了 1.69%，而重型先天性缺陷兒的比例更高達 3 至 4%，其中大多屬於遺傳性疾病，先天性心臟病的病例便超過了 0.8%。

我們為了要深入研究先天性心臟缺陷發生的原因，目前計劃建立以斑馬魚為模式系統，篩選斑馬魚中與其他動物心血管發育相關的同源基因，並對其分子結構與基因功能加以分析，研究胚胎時期心血管系統的發育以及調控此發育過程的分子機轉。可應用由斑馬魚所獲得的知識，探討各個基因的生理功能以及其與先天性心臟病之間的關聯性，期望可以找出人類先天性心臟病的成因。除了病理上的應用之外，將來這些基因也可能發展為產前診斷的檢查項目之一，篩檢患有先天性心臟病的胎兒，減少個人、家庭與社會的負擔。

目前我們已篩選到一個斑馬魚類似 transcription factor GATA-4 cDNA。其核二酸序列包含一完整的 open reading frame，由此推得的 coding region 可 encode 一 352 個胺基酸的 polypeptide，其中包含 8 個 cysteine residues，具有 zinc finger 構型，為 DNA-binding domain。並且也以其為探針，對斑馬魚的胚胎進行 whole mount *in situ* hybridization，結果顯示該基因只在心臟與消化管表達。繼續將分析其生理功能，我們針對 GATA-4 transcriptional factor

的特性，構築 gain- or loss- of-function constructs：以強力驅動子啟動 GATA-4 的表達；或利用 Max interacting protein (MXI) 抑制致癌基因 c-MYC 引發 carcinogenesis 的原理 (Schreiber-Agus, 1995; Roa, 1996)，設計一 dominant negative GATA-4，在細胞內大量表達，以分析其細胞生理、型態以及分化發育的變化，希望可以藉以初步解開控制心血管系統發育的分子機轉。

三、結果與討論

由於 GATA transcription factors 具有相當多的 loci，已知目前有 6 個 families。為了避免干擾其他 GATA 基因的功能，而分析 GATA-4 專一的生理功能，我們利用另一種策略，得到 dominant negative GATA-4：使用 MXI 抑制致癌基因 c-MYC 引發 carcinogenesis 的原理 (見圖一)。在細胞中，MXI 與 c-MYC 均可以與 MAD 結合為 heterodimer，而 MXI 的 N 端與一 transcriptional repressor 具有很高的親和力。當 MAD 與 c-MYC 結合時，會導致下游的致癌基因的表達，最終引發細胞病變；但當 MXI 與 MAD 結合時，便會形成 MAD/MXI/transcription repressor trimer，於是無法誘導下游致癌基因的表達。跟據 MXI 的 DNA 序列，我們設計了二個引子：

5'-ATGAATTCATGGAGCGGGTGCGGATGATCAACG-3'

5'-TTAATATTAGCCGGGGCTCGGCATGGAGGG-3'

對人類白血球 RNA 進行 reverse transcription (RT)-PCR 得到一段 126 nucleotides 的片段 (圖一A)，經由在 gene bank 中比對，得知該片段為 MXI N 端的部分序列 (圖一B)。

將所選殖的 MXI N 端片段接到 zGATAT-4 之前，得到 super-repressor GATA-4 (SRGATA-4)，在 MXI N 端之前並加讓 *EcoR* I 序列，以利後續構築工作，序列如圖二。繼續將 zGATA-4 (全長，FL；C 端 70 amino acid residues, C70) 與 SRGATA-4 三個 DNA constructs 接至

pGEX-4T 表現載體 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 的 glutathione *S*-transferase (GST) 之後，再送入 *Escherichia coli* XL-1 blue，藉 IPTG 大量誘導三種融合蛋白質 (GST-FLGATA-4、GST-C70GATA-4、GST-SRGATA-4) 在 *E. coli* 細胞中大量表達 (見圖三)。抽取細菌蛋白質時，分可溶性蛋白質 (soluble fraction) 及不溶性蛋白質 (insoluble fraction) 兩個部分，除了 GST-C70GATA-4 存在可溶性蛋白質部分之外，GST-FLGATA-4 及 GST-SRGATA-4 均存在於不溶性蛋白質部分。表示 GATA-4 蛋白質在 *E. coli* 細胞大量表達時，可能存在於 inclusion body 中。將來在改變表現載體、誘導條件或蛋白質抽取技術之後，希望能分離出具有活性的三種融合蛋白質。除了可以製備抗體之外，也可以把這些融合蛋白質送入動物細胞 (包括 myocardium、endocardium 或者 embryonic stem cell) 中，直接觀察這些細胞在獲得大量表達的全長 GATA-4 或 SRGATA-4，其生理、型態以及分化發育的變化。所構築的 DNA constructs 並可用來 transform 動物細胞，以確定 GATA-4 在心臟的分化發育與細胞存活中所扮演的生理功能。

目前我們已篩選到一個斑馬魚類似 GATA-4 transcription factor cDNA，分析其 DNA 序列可知該基因具有 zinc finger DNA-binding domain，並且也能以其為探針，對斑馬魚的胚胎進行 whole mount *in situ* hybridization，證明該基因在胚胎時期只會在心臟和消化道表達。除了在細胞內大量表達 zGATA-4 之外，我們並利用 MXI 的 N 端序列會與 corepressor 結合，抑制誘導 transcription 的特性，構築一 dominant negative zGATA-4，希望藉由 gain- 或 loss- of-function 的研究，分析 GATA-4 在心肌細胞的生長分化與存活的機轉。此外，也希望篩選一些與人類遺傳性心臟疾病相似的斑馬魚突變體，進一步研究該基因在心臟發育過程中所扮演的角色。

四、參考文獻

- Durocher, D., et al. (1997) The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16: 5687-5696.
- Fishman, M. C. and Stainier, D. Y. R. (1994) Cardiovascular development: Prospects for a genetic approach. *Circ. Res.* 74, 757-763.
- Ganim, J. R., et al. (1992) Mouse phospholamban gene expression during development in vivo and in vitro. *Circ. Res.* 71, 1021-1030.
- Goswami, S., et al. (1994) Differential expression of the myocyte enhancer factor 2 family of transcription factors in development: the cardiac factor BBF-1 is an early marker for cardiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5130-5138.
- Granato, M. and Nusslein-Volhard, C. (1996) Fishing for genes controlling development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 461-468.
- Grunwald, D. J., et al. (1988) A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. *Dev. Biol.* 125, 115-128.
- Kimmel, C. B., et al. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* 203, 253-310.
- Kirby, M. L., et al. (1995) Differential expression of the L10 ribosomal protein during heart development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 461-465.
- Ladd AN, et al. (1998) Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins. *Dev. Biol.* 204, 407-19
- Laverriere, A. C., et al. (1994) GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* 269, 23177-23184.
- Lyon, M. F. and Searle, A. G. (1989) *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*. Oxford, Oxford University Press.
- Mullins, M. C., et al. (1994) Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr. Biol.* 4, 189-202.
- Ramsdell, A. F. and Yost, H. J. (1999) Cardiac looping and the vertebrate left-right axis: antagonism of left-sided Vgl activity by a right-sided ALK2-dependent BMP pathway. *Development* 126: 5195-205.
- Rao, G., et al. (1996) mSin3A interacts with and can functionally substitute for the amino terminal repression of the Myc antagonist Mxi1. *Oncogene* 12:1165 – 1172.
- Schreiber-Agus, N., et al. (1995) An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell* 80, 777-86
- Stainier, D. Y. R., Fouquet, B., Chen, J.-N., Warren, K. S., Weinstein, B. M., Meiler, S. E., Mohideen, M.-A. P. K., Neuhauss, S. C. F., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Zwartkuis, F., Stemple, D. L., Malicki, J., Driever, W. and Fishman, M. C. (1996) Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* 123, 285-292.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. and Singer, F. (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293-296.
- Wei, Y., Bader, D. and Litvin, J. (1996) Identification of a novel cardiac-specific transcript critical for cardiac myocyte differentiation. *Development* 122, 2779-2789.

A

B

```

      M E R V R M I N V Q R L L E A A E F L E
      ATGGAGCGGGTGCGGATGATCAACGTGCAGCGTCTGCTGGAGGCTGCCGAGTTTTTGGAG 60
hMxi1 atggagcgggtgaagatgatcaacgtgcagcgtctgctggaggctgccgagttttggag
mMxi1 atggagcgggtgcggatgatcaacgtgcagcgcctgctggaggccgccgagttttggag
rMxi1 atggagcgggtgaagatgatcaacgtgcagcccatgctggaggccgccgagttttggag

      R R E R E C E H G Y A S S F P S M P S P
      CGCCGGGAGCGAGAGTGTGAACATGGCTACGCCTCTTCATTCCCCTCCATGCCGAGCCCC 120
hMxi1 cgccgggagcgcgagagtgtgaacatggctacgcctcttcattcccgtccatgccgagcccc
mMxi1 cgcagggagcgcgagagtgtgaacatggctacgcctcatcgttcccctccatgccgagcccc
rMxi1 cgcagggagcgcgagagtgtgaacatggctacgccttcatcattcccctccatgccgagcccc

      R L
      CGGCTA 126
hMxi1 cgactg
mMxi1 cggcta
rMxi1 cggcta
```

圖一：經由人類白血球 RNA 進行 (RT)-PCR 得到 MXIN 端片段。A, PCR 所複製的 DNA 經轉殖至載體後的電泳圖。B, DNA 序列經定序後與 gene bank 比對結果，hMxi1 (accession number XM_045326), mMxi1 (NM_005962), rMxi1 (NM_013160) 分別代表人、mouse 及 rat 的 Mxi1 基因。序列上方為由 DNA 所推測的胺基酸序列。

(見成果報告9001.ppt)

圖二：MXI N 端片段與全長 zGATAT-4 相接得到融合蛋白質 super-repressor GATA-4 (SRGATA-4)。最前方加入一 *EcoR* I 序列 (以底線標示), 以便後續構築; MXI N 端序列以粗體表示。

圖三：斑馬魚 GATA-4 三種 DNA constructs (GST-FLGATA-4、GST-C70GATA-4、GST-SRGATA-4) 送入 *Escherichia coli* XL-1 blue，藉 IPTG 大量誘導其表達。GST-C70GATA-4 (C70) 存在於可溶性蛋白質部分，而GST-FLGATA-4 (FL) 及 GST-SRGATA-4 (SR) 則只存在於不溶性蛋白質部分。箭頭 (arrow head) 標示為 glutathione *S*-transferase，箭號 (arrows) 標示為三種融合蛋白質。