

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫名稱：探討雙同源箱基因 Duxbl 调控體外生殖細胞分化的分子機制 *
* *****

執行計畫學生： 尤冠婷
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-036-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 王淑紅

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 105年03月30日

【目錄】

I. 摘要	-----	2
II. 研究動機與研究問題	-----	2-3
III. 文獻回顧與討論	-----	3-4
IV. 研究方法與步驟	-----	4-6
V. 結果與討論	-----	7-12
VI. 參考文獻	-----	12-13
VII. 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表	-----	14-15

探討雙同源箱基因 *Duxbl* 調控體外生殖細胞分化的分子機制

(一).摘要

同源箱基因(homeobox gene)是一群調節個體生長發育的基因家族，最早在果蠅中被發現。過去我們實驗室發表的小鼠雙同源箱基因 (murine double-homeodomain gene) --*Duxbl* 基因具有兩個同源箱區，因此命名為雙同源箱基因，*Duxbl* 同源箱區與人類雙同源箱基因 *DUX4* 具有67%的相似度。人類 *DUX4* 被認為是造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症(FSHD)的候選基因，而且 *Duxbl* 是目前唯一發現存在鼠類完整有功能的雙同源箱基因，由我們過去的研究也顯示，異常的 *Duxbl* 與 *DUX4* 表現都造成肌細胞的分化異常，代表人類 *DUX4* 與鼠類 *Duxbl* 在蛋白結構與功能上有一定程度的相似性。而 *Duxbl* 除了參與肌肉發育之外，*Duxbl* 在胚胎幹細胞、spermatogonia、oocyte，以及神經細胞中的也有很高的表現量，同樣的人類 *DUX4* 在 testis 及 iPS 的表現量也很高，推測雙同源箱基因在早期胚胎發育及生殖細胞的發育上扮演很重要的角色。

Duxbl 的表現分佈在性腺發育過程中從胚胎時期的性腺到成熟後皆有，且特別表現在 oocytes 和 spermatogonia，因此可知 *Duxbl* 在生殖細胞的發育上扮演了重要的角色。由於早期胚胎及生殖細胞取得不易，本計劃將以 P19 細胞為模式，研究 *Duxbl* 雙同源箱基因調控體外生殖細胞分化的分子機制。P19 癌化胚幹細胞與胚胎幹細胞相似，具有增生及分化的能力。而 RA 為原始生殖細胞 (Primordial germ cells: PGC) 的 inducer，可誘導胚胎幹細胞轉為 PGCs，亦能促 germ cells 進入減數分裂。因此我們以不同濃度的 RA 誘導 P19 細胞分化，接著分析 *Bmp4* (spermatogonia stem cell marker), *plzf* (undifferentiated spermatogonia), *Stra8* (premeiotic cells) 及 *dazl* (entering meiosis) 的表現及 *Duxbl* 的表現，藉此了解 *Duxbl* 的表現分佈與各生殖細胞發育時期標記基因的相關性。另外我們也篩選過度表現或減少 *Duxbl* 表現的 P19 stable clone 並進行體外生殖細胞分化，藉此探討 *Duxbl* 對於體外生殖細胞分化的影響。

(二) 研究動機與研究問題

研究動機：

由實驗室過去的研究顯示，*Duxbl* 表現於小鼠生殖細胞，包括卵細胞與精細胞 (Wu, et al., 2010)，同樣的 *DUX4* 也表現於人類的 testis (Geng, et al., 2012, Snider, et al., 2010)，雖然雙同源箱基因正常的生理功能並不清楚，但由於 *Duxbl* 與 *DUX4* 確實都表現在生殖細胞，又將 *DUX4* 過度表現於人類 myoblast 細胞可以活化提高生殖細胞及早期胚胎發育相關基因的表現，同時在異常表現 *DUX4* 的 FSHD 病人的肌肉組織也發現生殖細胞及早期胚胎發育相關基因的表現也增加了 (Geng, et al., 2012)，雖然 *Duxbl* 與 *DUX4* 分屬不同物種的雙同源箱基因，但由以上的研究推測雙同源箱基因參與哺乳動物的生殖發育系統，所以本研究目標將以小鼠

Duxbl 為模式探討雙同源箱基因如何參與生殖細胞的發育尤其是精細胞，由我們的研究顯示，由 RT-PCR 的分析顯示(Fig. 1) *Duxbl* 不表現於性腺的體細胞，但 Northern blot 的分析顯示(Fig. 2)，3 週大小鼠 testis 的 *Duxbl* 表現量較 5 週 testis 多，由 IHC 的分析顯示 *Duxbl* 表現於 spermatogonia (Fig. 3)，另外以 RT-PCR 分析不同發育時期 testis 的 *Duxbl* 基因表現，結果顯示，*Duxbl* 在出生後 7 天的表現量最高，之後 *Duxbl* 的表現開始下降在成熟的 testis 維持低量的表現，由於小鼠出生後 10 天內屬於 spermatogonia 的增生期(Huang, et al., 2013)，又結合 IHC 的結果，我們推測 *Duxbl* 表現於增生時期的 spermatogonia 細胞，由於基因轉殖或剔除的研究相當耗時且有困難度，因此本研究主題將以 P19 癌化的胚幹細胞為模式進行體外分化為生殖細胞，分析不同發育時期精細胞的標記基因的表現及 *Duxbl* 基因的表現分佈，推測 *Duxbl* 的表現是否與特定的標記基因的分佈成正相關，另外也篩選 *Duxbl* 過度表現的 P19 細胞一樣進行生殖細胞的分化，分析 *Duxbl* 過度表現是否影響生殖細胞的分化，同時也可以了解 *Duxbl* 參與生殖細胞分化的可能分子機制，經由 *Duxbl* 對於生殖細胞發育的調控機制的研究，除了可以了解雙同源箱基因在生殖細胞發育上的功能之外也可以藉此了解 DUX4 造成 FSHD 疾病的可能分子機制，進而研發出有效治療 FSHD 的藥物。

研究問題：

1. 以 P19 細胞株為細胞模式，以 10, 100, 500 nM, 1 μM 的 RA 各誘導一天及三天及五天時，觀察並分析其細胞型態的變化。
2. 以 P19 細胞株為細胞模式，將 *Duxbl*-v5 表現載體轉染至細胞使其過量表現 *Duxbl* 基因，得到的 P19[*Duxbl*] 與 P19[control]，以 RT-PCR 分析 *Bmp4* (spermatogonia stem cell marker), *plzf* (undifferentiated spermatogonia), *Stra8* (premeiotic cells) 及 *dazl* (entering meiosis) 的表現及 *Duxbl* 的表現，藉此了解 *Duxbl* 的表現分佈與各發育時期標記基因的相關性。

(三) 文獻回顧與討論

同源箱基因家族 (homeobox gene families) 普遍存在高等及低等動物中，不同的同源箱基因藉由高度保留的同源箱區(homeodomain) 60 個胺基酸，形成 helix-turn-helix 的結構與特定 DNA 序列結合，而調節下游基因之表現 (Gehring et al., 1994)。

DUX 家族包含 intronless 的 *DUX4* 及鼠類的 *Dux* (Clapp, et al., 2007) 及有 intron 的 *DUXA*, *DUXB*, *DUXBL* 及 *DUXC* 次家族 (Leidenroth and Hewitt, 2010)，但真正了解其基因分子結構及證實有基因產物存在的雙同源箱基因只有人類的 *DUX4* 及鼠類 *Duxbl*。鼠類 *Duxbl* 同源箱區與人類 *DUX4* 有高達 67% 的相似度，人類 *DUX4* 被

認為是造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症(FSHD)的候選基因，其致病機轉並不清楚，目前也沒有可以有效治療FSHD的藥物，而*Duxbl*是目前唯一發現存在鼠類完整有功能的雙同源箱基因（非pseudogene）。由我們過去的研究也顯示，*Duxbl*與*DUX4*都表現於肌細胞，而且異常的*Duxbl*與*DUX4*表皆會造成肌細胞的分化異常，代表人類*DUX4*與鼠類*Duxbl*在蛋白結構與功能上有一定程度的相似性。此外亦有研究發現*DUX4*表現在人類正常組織如testis及iPS中(Snider et al., 2010)，代表*DUX4*在人類早期胚胎發育上也扮演重要角色，同樣的小鼠*Duxbl*在spermatogonia及胚幹細胞也有表現，另外由卵細胞到著床前胚也都有高量*Duxbl*基因的表現(Wu et al., 2010)，推測雙同源箱基因在早期胚胎發育及生殖細胞的發育上扮演很重要的角色。由於不管是人類或小鼠早期胚胎組織或生殖細胞的取得都不容易，因此本研究以P19細胞為模式，研究*Duxbl*雙同源箱基因調控體外生殖細胞分化的分子機制。

P19細胞是由teratocarcinoma(畸胎瘤)所分離出來的細胞株，P19細胞與胚胎幹細胞相似，具有增生及分化的能力，未分化的P19細胞表現高量的alkaline phosphatase(ALP)及胚幹細胞的標記基因*Oct4*，由於P19細胞培養時不需添加LIF或feeder cell，又有很好的分化潛力，因此在研究早期胚胎發育的分子機制上，P19是一個很好的組織培養系統。而RA為PGCs inducer，可誘導胚胎幹細胞轉為PGCs，亦能促germ cells進入meiosis。因此我們以不同濃度的RA誘導P19細胞，接著分析*Bmp4*(spermatogonia stem cell marker)，*plzf*(undifferentiated spermatogonia)，*Stra8*(premeiotic cells)及*dazl*(entering meiosis)的表現及*Duxbl*的表現，藉此了解*Duxbl*的表現分佈與各發育時期標記基因的相關性。

精細胞發育的過程(spermatogenesis)是有性生殖雄性動物的睪丸中，生殖細胞從精原細胞一直發育到成熟精子的過程，其中包含增生期(Spermatogonial proliferative phase)，減數分裂期(Meiotic phase)，精子發生期(Spermiogenic phase)。小鼠出生一週左右，生殖幹細胞會慢慢轉變成雙倍體的精原細胞(spermatogonia)，精原細胞依然擁有有絲分裂(mitosis)能力。當小鼠發育至出生後10天，精原細胞便進入第一次減數分裂前期，形成初級精母細胞(Primary spermatocyte)，之後初級精母細胞第一次減數分裂形成次級精母細胞(Secondary spermatocyte)。次級精母細胞會快速的再度進入第二次減數分裂形成完整的單倍體圓精細胞(round spermatid)。

(四) 研究方法與步驟

(1). 將 3.2×10^6 的 P19 細胞培養於 10cm dish 隔夜培養，並以 0, 10nM, 100nM, 500nM 及 4 μ M 的 RA 各誘導一天及三天及五天。於誘導第一、三、五天拍細胞型態，並萃取 RNA 進行 RT-PCR 分析 *Bmp4*(spermatogonia stem cell marker)，*plzf*(undifferentiated spermatogonia)，*Stra8*(premeiotic cells)，*dazl*(entering meiosis)的

表現及 *Duxbl* 的表現，藉此了解 *Duxbl* 的表現分佈與各發育時期標記基因的相關性。

(2). 以現有的 *Duxbl*-v5 表現載體轉染至 P19 細胞以 500 g/ml G418 篩選 2 週後，得到的 P19[*Duxbl*]與 P19[control]，再根據以上(1)的方法進行生殖細胞的分化，分析 *Duxbl* 過度表現是否影響不同時期的標記基因的表現，進而了解 *Duxbl* 參與生殖細胞發育的可能分子機制。

I. 以 0, 10nM, 100nM, 500nM 及 4 μ M RA 分別誘導 P19 cell 一、三、五天分化為生殖細胞

目的：因 P19 細胞是由 teratocarcinoma 所分離出來的細胞株，P19 細胞與胚胎幹細胞相似，具有增生及分化的能力。而 RA 為 PGCs inducer，可誘導胚胎幹細胞轉為 Primordial germ cells，亦能促 germ cells 進入 meiosis。因此我們以不同濃度的 RA 誘導 P19 細胞分化，再去分析 *Duxbl* 的表現分佈與精子生成過程中 marker genes 的表現分布是否相似，藉此推測 *Duxbl* 參與生殖細胞發育的可能時間點。

方法：

1. 於 10cm dish 種 3.2×10^6 的 P19 cell
2. 將 1mM RA 稀釋於 95% EtOH 當中，配置不同濃度 RA
2. 以 10nM, 100nM, 500nM 及 4 μ M 的 RA 各誘導 24、48、72 及 120 小時
3. 並於誘導 24、48、72 及 120 小時拍攝細胞型態
4. 萃取 RNA 進行 RT-PCR 分析 marker gene (*Bmp4, plzf, Stra8, dazl*) 的表現及 *Duxbl* 的表現

II. 抽 RNA

目的：由細胞中萃取 total RNA

方法：

1. DEPC-PBS wash
2. 加入 Tri-reagent 1 mL/10 cm dish
3. 以刮棒刮下後吸至 2c.c. eppendorf
4. 每 1c.c. Tri-reagent 加入 200ul chloroform
5. Vortex 15 秒，冰上兩分鐘
6. 離心 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15 分鐘
7. 將上層吸至新 1.5c.c. eppendorf (留 1mm 不吸)
8. 每 1c.c. Tri-reagent 加入 500 μ l isopropanol，上下翻轉後靜置十分鐘
9. 離心 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 分鐘，去除上清液留 pallet
10. 加入 1c.c. 75% RNA 用酒精，vortex 至 pallet 溶於液體中
11. 離心 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 分鐘，去除酒精
12. 再次離心，並吸除殘餘酒精

13. 開蓋風乾十分鐘
14. 以15µl DEPC-ddH2O回溶
15. 測OD值及跑膠確認

III. RT-PCR(2µg RNA)

目的：將萃取出mRNA反轉錄成沒有intron的cDNA

方法：

1. _____

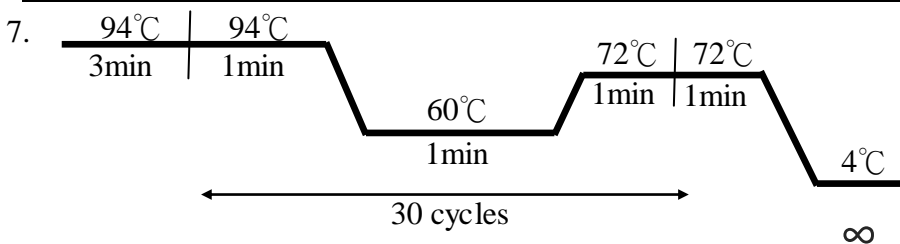
Sample(RT)	
2ug RNA	X µl
Primer:oligo(dT)20	1 µl
DEPC-treated water	12-x µl
Total 13 µl RNA/primer mixture	

1. PCR 65°C , 10分鐘
2. 馬上冰上一分鐘
3. _____

Sample(RT)	
5x PT buffer	4 µl
10mM dNTP mixture	2 µl
RNase inhibitor	0.5 µl
Revers transcriptase	0.5 µl

4. 吸吐數次混合
5. 55°C,1小時, 85°C,五分鐘
6. _____

	Sample	control
d2H2O	18 µl	18 µl
10x PCR buffer	2.5 µl	2.5 µl
10mM dNTPs	1 µl	1 µl
Primer(F)	1 µl	1 µl
Primer(R)	1 µl	1 µl
Taq polymerase	0.5 µl	0.5 µl
cDNA	1 µl	-
Total	25 µl	24µl

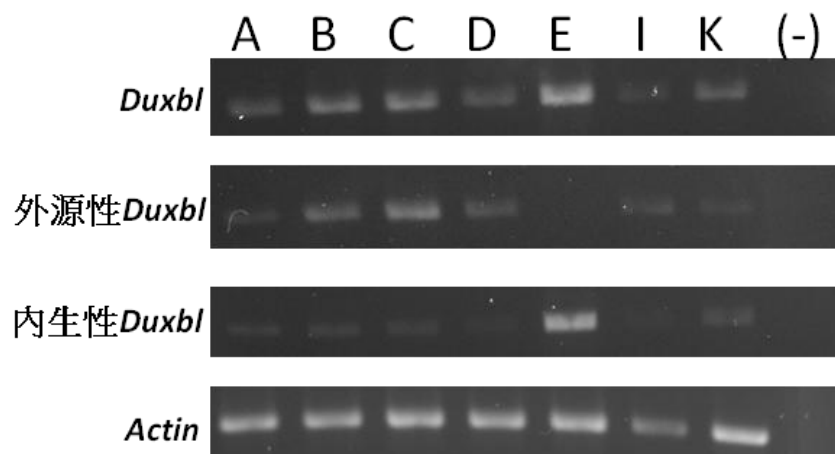


8. 依不同primer設定不同annealing temperature。

(五) 結果與討論

結果：

(1) 以 RT-PCR 分析 *Duxbl* 選出 P19[Duxbl]cell 中表現量最高的 clone

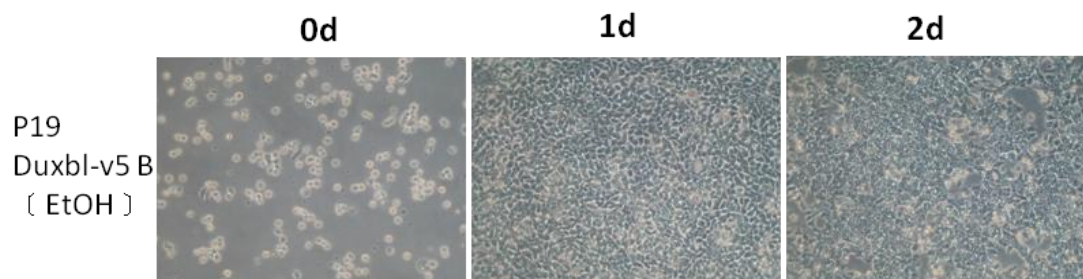


由結果(1)看出 P19[Duxbl] clone C 外源性的表現量最高，亦由 Western blot 分析(Anti-v5)做二次確認，最後選擇 P19[Duxbl] clone C 做往後的實驗。

(2) 以不同濃度 RA 誘導 P19 細胞為雄性生殖細胞_細胞型態

A. 以95% EtOH處理P19 *Duxbl*-v5

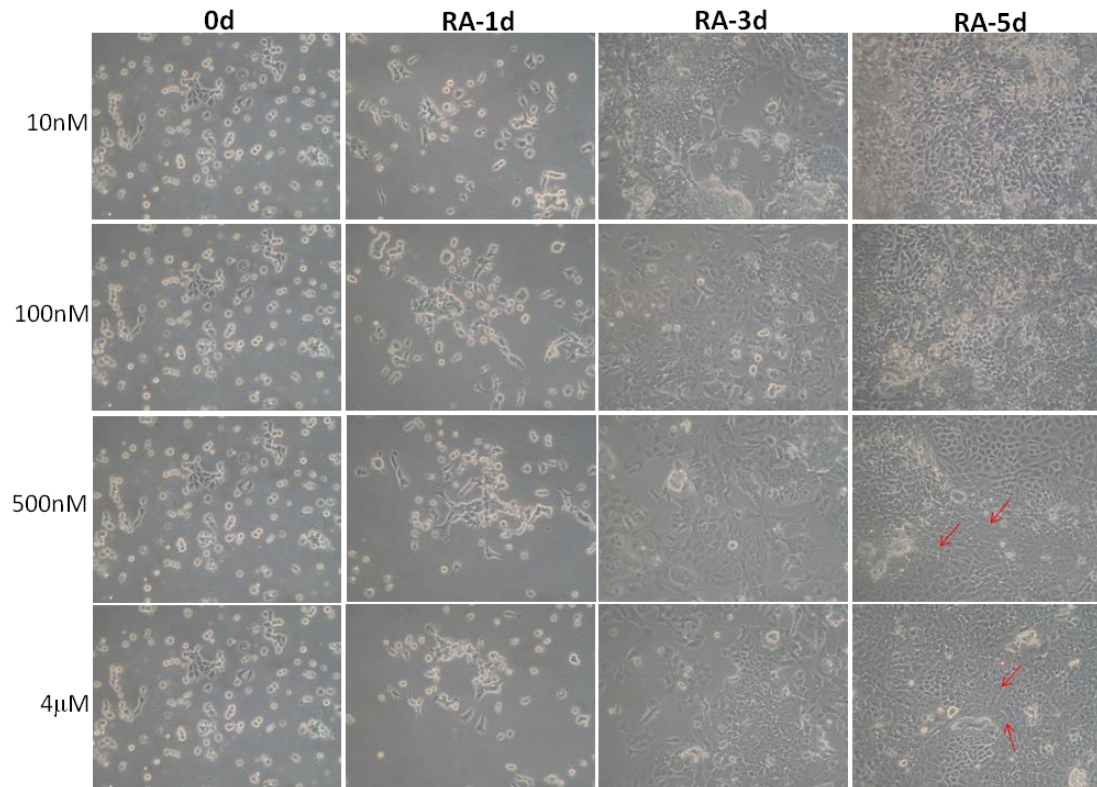
目的：欲先確認在95% EtOH處理之下，是否影響P19細胞的生長與型態。



由結果(A)可看出，在95% EtOH處理之後，細胞僅隨天數而數量增加，並不會影響P19細胞的生長與型態。因此可確定RA溶於95% EtOH中，其形態變化的變因為RA誘導所導致。

B. P19 only-經10,100,500nM,4 μ M RA分別誘導後之細胞型態

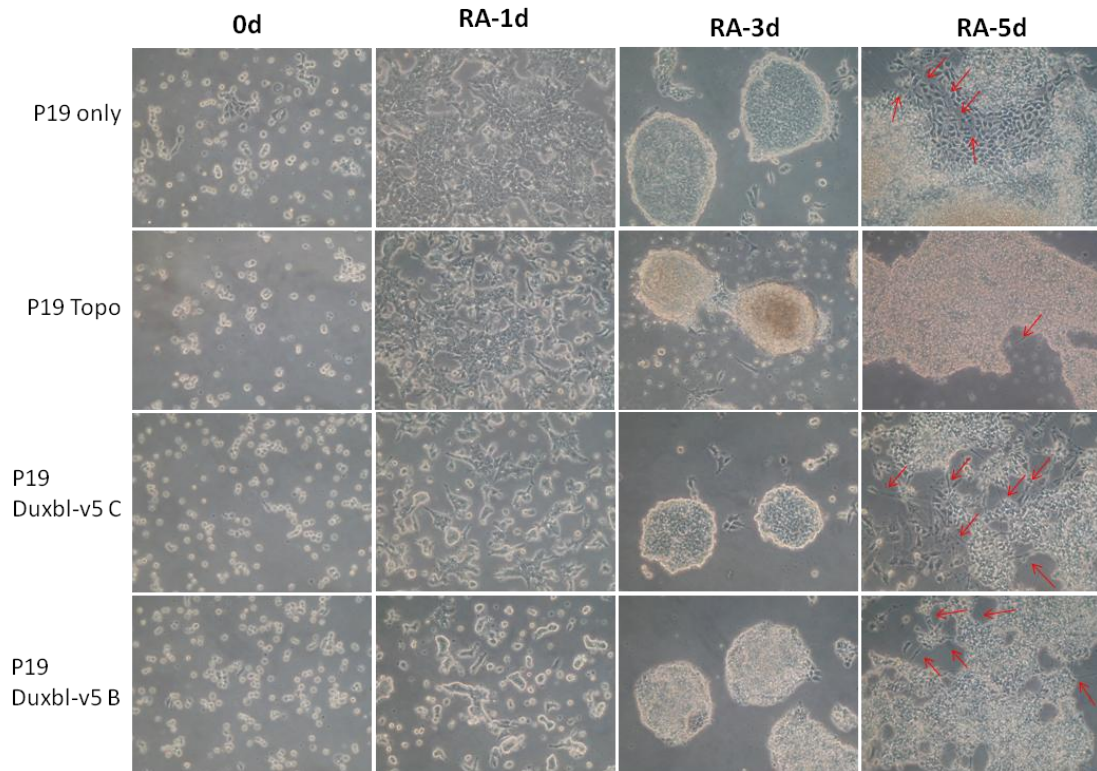
目的：欲了解低中高濃度RA是否造成P19 only細胞型態上的改變。



由結果(B)可得知，以低劑量(10,100nM)誘導P19 only，僅觀察到細胞數隨天數增加，在第五天未看到細絲的產生。而以中高劑量(500nM,4μM)誘導P19 only，在第五天可以觀察到類似神經的細絲產生。

C. 以1μM RA誘導P19 cell

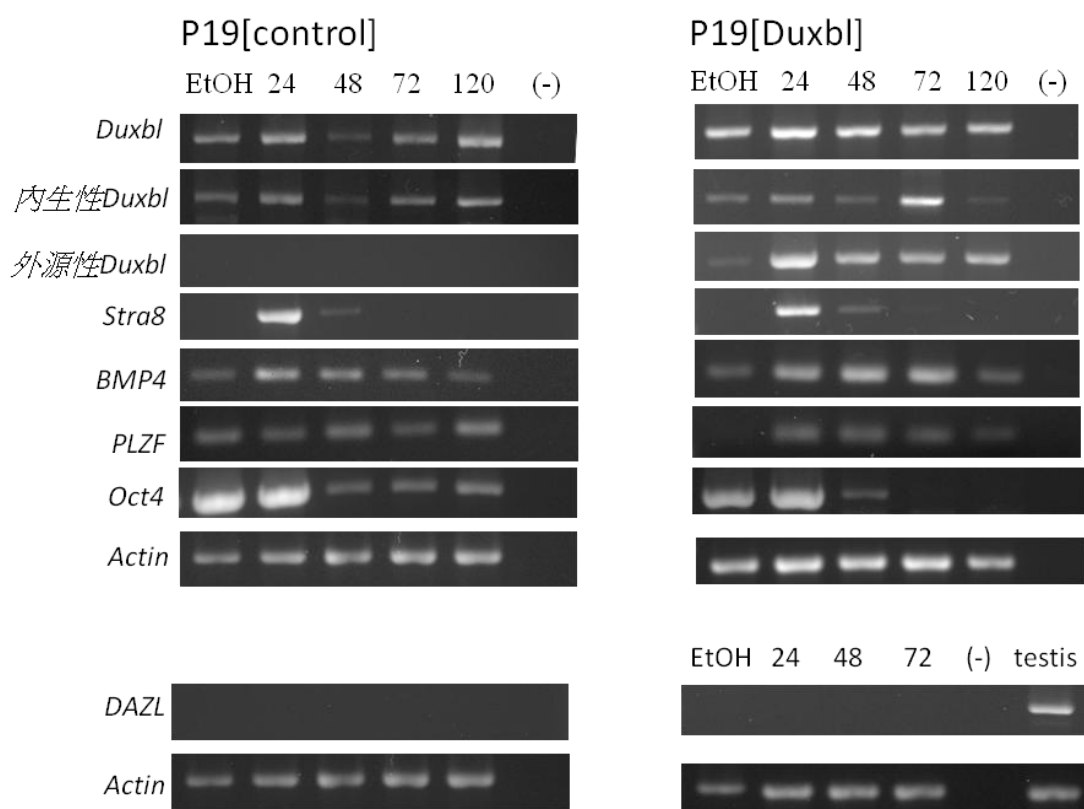
目的：欲了解在相同濃度(1μM)的RA誘導之下，P19 only/P19 Topo-B/P19 Duxbl-v5 C/P19 Duxbl-v5 B 個別受誘導後型態上的變化。並觀察不同clone的P19 Duxbl-v5 是否在RA誘導後皆有相同型態改變。



由結果(C)可得知，以高劑量 $1\mu\text{M}$ RA誘導 P19 only與 P19 Topo-B，第三天可觀察到細胞逐漸聚集為團狀呈現類似EB的型態，在第五天皆可以觀察到大部分的細胞呈現片狀的聚集，並有類似神經的細絲的產生。而以高劑量 $1\mu\text{M}$ RA誘導 P19 Duxbl-v5 C，第三天同樣地可以觀察到細胞呈現類似EB的型態，在第五天可以觀察到許多類似神經的細絲產生。而同樣的型態改變在P19 Duxbl-v5 B中亦可觀察到。由此可知，不同clone的P19 Duxbl-v5在RA誘導後皆有相同型態改變。

- (3) 分析比較P19[control]與P19[Duxbl]，以 $1\mu\text{M}$ RA誘導24、48、72及120小時，*Duxbl*的表現分佈與以上所提由stem cell到spermatogonia及male germ cell的表現分佈是否相似，藉此推測*Duxbl*參與生殖細胞發育的可能時間點。

A. 比較P19[control]與P19[Duxbl]兩組相關生殖標記基因的表現



B. 下圖將結果(A)RT-PCR結果之各別基因表現做量化，表現程度以“+”號多寡顯示，若不表現則以“-”號表現之。

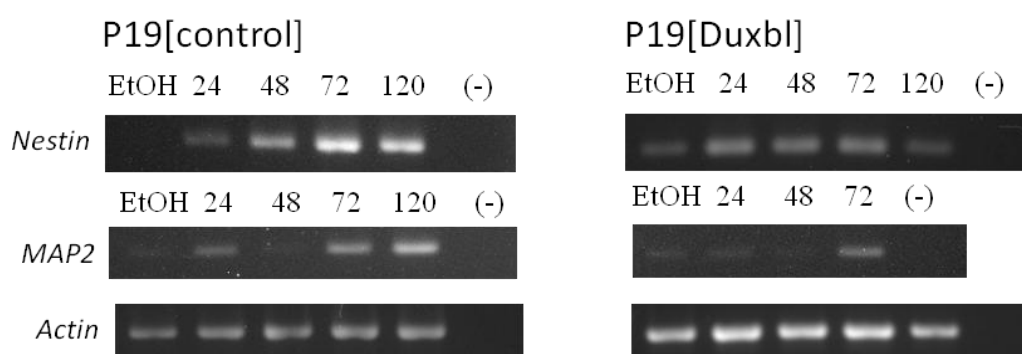
	P19[control]					P19[Duxbl]				
	EtOH	24	48	72	120	EtOH	24	48	72	120
Duxbl	+++	+++	+	++	+++	++	+++	++	+	++
內生性Duxbl	++	+++	+	++	+++	++	++	+	+++	+
外源性Duxbl	-	-	-	-	-	+	+++	++	++	++
Stra8	-	+++	+	-	-	-	+++	+	-	-
BMP4	+	+++	++	+	+	+	++	++	++	+
PLZF	+++	+	++	+	++	+	++	++	++	++
Oct4	+++	++	+	+	+	+++	+++	+	-	-

由結果(3)- P19[control]可得知，*Oct4* (undifferentiated cell) 表現在P19 Topo細胞中，並持續表現至24hr，48hr後表現量大幅減少，顯示細胞經1 μ M RA誘導進入分化。而*Duxbl*在RA誘導24hr後大量表現，48hr表現量下降，而後又上升。*Stra8* (stimulated by retinoic acid gene 8)為直接受RA誘導所表現的基因，其在1 μ M RA誘導24hr後大量表現，48hr僅微量表現，顯示P19細胞確實成功受RA誘導並表

現*Stra8*。同時 *BMP4* (spermatogonia stem cell marker)的表現量於1 μ M RA誘導24hr後表現量大量增加，而後開始下降，顯示細胞開始脫離Spermatogonial stem cells 的時期，走向下一階段。*PLZF* (undifferentiated spermatogonia)於1 μ M RA誘導24hr後表現，此時的細胞為未分化的精原細胞(As,Ap,Aal Spg)，其表現量隨*BMP4*下降而漸增，顯示大部分的細胞開始由As Spg走向Ap,Aal Spg時期。生殖分化後期標記基因*DAZL* (entering meiosis)為進入減數分裂時所表現的基因，由結果推斷可能是尚未有足夠的細胞受誘導進入減數分裂為spermatocyte，因此目前還未看到*DAZL*的表現。

而由結果(3)- P19[Duxbl]可得知，*Oct4*表現在P19 Duxbl-v5中，並持續表現至48hr，而在72hr後則無表現，表示幾乎所有的細胞經1 μ M RA誘導皆進入分化。*Duxbl*在1 μ M RA誘導24hr後大量表現，欲了解24hr的表現量增加是由於內生或外源的*Duxbl*所造成，由結果可看出，24hr時*Duxbl*的大量表現是由於外源性*Duxbl*受RA誘導所表現的。*Stra8*在1 μ M RA誘導24hr後大量表現，48hr僅微量表現，顯示P19細胞確實成功受RA誘導並表現*Stra8*。同時*BMP4*的表現量亦於1 μ M RA誘導24hr後增加，但和P19[control]相比可以發現其表現會維持等量至72小時，到了120hr才下降，顯示過量表現會使得細胞停留於Spermatogonial stem cells 的時期而延緩分化。而*PLZF*在1 μ M RA誘導24hr後開始表現，並維持其表現至120hr，顯示細胞仍處於未分化的Spermatogonia(As,Ap,Aal Spg)，且由於*BMP4*的表現時間延長，使*PLZF*的表現量上調受到抑制，因此與P19[control]相比P19[Duxbl]中*PLZF*的表現是等量維持的。*DAZL*為進入減數分裂時所表現的基因，由結果推斷可能是因為過量表現*Duxbl*使得細胞停留於Spermatogonial stem cells 的時期而延緩分化，因此尚未有足夠的細胞受誘導進入減數分裂為spermatocyte，所以未能看到*DAZL*的表現。

- (4) 由於結果(3)中，我們並沒有看到*DAZL* (entering meiosis marker gene)的表現，因此我們以神經標記基因，Nestin(neural stem/progenitor cell marker)與MAP2(mature neuronal marker)做RT-PCR分析，藉此了解大部分的細胞受RA誘導後是否走向神經分化。



由結果(4)可以看到以RA誘導後，隨著誘導時間*Nestin*的表現逐漸下降，而*MAP2*的表現漸增，顯示以1 μ M RA誘導後使大部分細胞走向神經分化。

【討論】

從細胞形態可以發現當我們以高劑量(500nM,1 μ M 及 4 μ M)RA 誘導 P19 細胞至第五天時，觀察到類似神經細絲的型態，這與其他實驗室所發表的 paper(Zhang et al., 2014)是相符合的。而從 RT-PCR 的結果看來 P19[Duxbl]中 *BMP4* 的表現與 P19[control]相比延長了表現時間，因此我們推測過量表現 *Duxbl* 會使細胞維持 Spermatogonial stem cells(=As Spg)的時期而延緩生殖分化，造成 *PLZF* 表現時間延長，並延緩 *DAZL* 的表現時間點。但在 P19[control]的結果中，我們經多次重複分化實驗，依舊未如上述 paper 於第五天看到 *DAZL* 的高表現，顯示其培養與誘導方式可能還需作調整，才能使足夠的細胞受誘導進入減數分裂為 spermatocyte。

而在形態上我們也發現在 P19[Duxbl]中與 P19[control]相比有較多神經細絲的產生，因此我們以神經標記基因，如 *Nestin*(neural stem/progenitor cell marker)與 *MAP2*(mature neuronal marker)做分析，發現以 1 μ M RA 誘導後神經標記基因表現增加。顯示過量表現 *Duxbl* 確實會促使其走向神經分化，這與先前其他實驗室的研究顯示過量表現人類 *DUX4* 會抑制肌肉分化，而促使細胞走向神經分化 (Abhijit Dandapat et al., 2013)的結果相同。

因此我們認為在 RA 誘導第三天看到的團狀細胞聚集可能是 neurosphere，而我們以 1 μ M RA 誘導 P19 細胞，使得大部分細胞走向神經分化，僅部分細胞往生殖分化，因此在 RT-PCR 的結果中 120hr 無法看到 *DAZL* 的表現，而是 *Nestin* 及 *MAP2* 的表現增加。

(六) 參考文獻

- Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, Tapscott SJ (2012) DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Dev Cell* 22:38-51
- Huang SL, Chou TC, Lin TH, Tsai MS, Wang SH (2013) Gcse, a novel germ-cell-specific gene, is differentially expressed during meiosis and gametogenesis. *Reprod Sci* 20:1193-1206
- Snider L, Geng LN, Lemmers RJ, Kyba M, Ware CB, Nelson AM, Tawil R, Filippova GN, van der Maarel SM, Tapscott SJ, Miller DG (2010) Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene. *PLoS Genet* 6:e1001181
- Wu SL, Tsai MS, Wong SH, Hsieh-Li HM, Tsai TS, Chang WT, Huang SL, Chiu CC, Wang SH (2010) Characterization of genomic structures and expression

profiles of three tandem repeats of a mouse double homeobox gene: *Duxbl*.
Dev Dyn 239:927-940

Zhang L, Tang J, Haines CJ, Feng H, Teng X, Han Y (2014) RA induces
differentiation of multipotent P19 cells towards male germ cell. *In Vitro Cell
Dev Biol Anim*

Wong SH, Wang SH (2009) Expression profiles and function analyses of the mouse
double homeobox gene : *mDUX*. *Developmental Dynamics*

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

- 達成目標
- 未達成目標（請說明，以 100 字為限）
- 實驗失敗
- 因故實驗中斷
- 其他原因

說明：我們依照其他實驗室(Zhang 等人)所發表論文中的分化方式進行雄性生殖細胞的分化實驗，經多次實驗仍無法使大部分細胞走向生殖細胞的分化，而我們也從 RT-PCR 的結果得知，大多的細胞是走神經分化而非生殖分化，因此我們無法建立原始 P19 生殖分化的細胞模式。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

- 論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無
- 專利：已獲得 申請中 無
- 技轉：已技轉 洽談中 無
- 其他：(以 100 字為限)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以500字為限）

雖然我們依照其他實驗室(Zhang 等人)所發表論文中的培養及分化方式進行雄性生殖細胞的分化實驗，無法使大部分細胞走向生殖細胞的分化，使我們不能繼續作往後更深入的實驗。但在 P19[Duxbl]與 P19[control]的 RT-PCR 結果中，兩組別生殖相關基因表現相互比較之下，我們可以推測過量表現 *Duxbl* 會使細胞維持 Spermatogonial stem cells(=As Spg)的時期而延緩生殖分化，造成 *PLZF* 表現時間延長，並延緩 *DAZL* 的表現時間點。

而從細胞型態上，我們也可以發現過量表現 *Duxbl* 確實會促使其走向神經分化，同時驗證先前其他實驗室的研究顯示過量表現人類 DUX4 會抑制肌肉分化，而促使細胞走向神經分化(Abhijit Dandapat et al., 2013)的結果。