

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

闡明雙同源箱基因Duxbl對於哺乳類動物肌肉再生及胚胎發育的 角色

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2320-B-040-015-
執行期間：104年08月01日至105年07月31日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

計畫主持人：王淑紅

計畫參與人員：大專生-兼任助理人員：李沅蓉
大專生-兼任助理人員：賴禹安

中華民國 105 年 10 月 31 日

中文摘要：哺乳動物發育是一個複雜的過程，尤其是組織的再生及早期胚胎發育的分子機制，我們對其了解更為有限。同源箱基因家族除了調控個體發育及器官形成之外，異常的表現也會造成疾病的生成。雖然目前已知的同源箱基因很多，但對於具有兩個同源箱區的雙同源箱基因在哺乳類動物的發育過程與再生物體的生理功能皆不清楚。我們發表第一個也是目前唯一發現的小鼠雙同源箱基因 Duxbl，Duxbl 蛋白參與小鼠胚胎時期肌肉發育與成鼠的受傷肌肉組織修復及再生，Duxbl 與人類 DUX4 蛋白的同源箱區相似度高達 67%，DUX4 被認為是造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症 (FSHD) 的主要候選基因。本研究目標延續過去的研究，以鼠類 Duxbl 基因來探討雙同源箱基因在哺乳類動物的早期胚胎發育及個體發育所扮演的角色，分別以細胞模式及基因剔除動物來達成研究目標。在細胞模式方面，以癌化的 P19 胚幹細胞進行體外肌肉細胞分化，研究結果顯示 Duxbl 異常表現會抑制 P19 細胞進行肌肉分化，減少表現 MHC 蛋白的 myotube 數量，同時肌肉母細胞標記基因 MyoD 與分化標記基因 MyoG 表現量降低，同時我們也發現肌肉前趨細胞標記基因 Pax3 及 Pax7 表現量皆增加了，尤其 Pax7 表現量增加較多；此結果與過去我們所發表的 Duxbl 蛋白抑制 C2C12 肌纖維母細胞分化結果相呼應；另外，我們以 RA 誘導 P19 細胞進行神經分化的過程中，當 Duxbl 過度表現後促進 Nestin 的表現，但抑制 MAP2 的表現，促使細胞維持在圓形增生的神經前驅細胞的狀態。在第六天分化時持續表現 Duxbl 的 P19 [Duxbl] 細胞中有較高比例的細胞具有 NeuN 及 Nestin 的訊號。因此，我們推論 Duxbl 會促進 Nestin 的表現使神經前趨細胞增加，但是有抑制神經前趨細胞細胞分化為 neurite (MAP2) 的能力。另外，在產製 Duxbl 基因剔除鼠的研究上，我們產製 rDuxbl 基因剔除大鼠，因為大鼠只有一個 rDuxbl 基因並沒有小鼠上 Duxbl 基因三重複的現象。大鼠 rDuxbl 與小鼠 Duxbl 蛋白具有 80% 相似度，同源箱區胺基酸序列具有 93-95% 的相似度，大鼠 rDuxbl 蛋白表現分佈與小鼠 Duxbl 的表現分佈類似，主要在 brain, ovary 與 testis 可以偵測到 Duxbl 蛋白的表現，同時我們自製的 Duxbl 的抗體可以同時辨識大鼠與小鼠的 Duxbl 蛋白。但是以 CRISPR-Cas9 系統產製 rDuxbl 基因剔除大鼠，無法成功的產出 rDuxbl (+/-) 異型合子，推測可能剔除單一 rDuxbl 基因就造成胚胎死亡無法正常發育，進一步體外培養 rDuxbl 基因剔除受精卵至囊胚期，發現 Cas9 可以正確截切染色體 DNA，但無法成功地切除大片段的 DNA，因此推測 rDuxbl 基因對於早期胚胎發育是必須的，未來將以條件式基因剔除大鼠來分析 rDuxbl 在發育與疾病相關的功能。

中文關鍵詞：雙同源箱基因；Duxbl；癌化的胚幹細胞；基因剔除；胚胎發育；肌肉修復及再生；體外分化；神經分化；同源箱區

英文摘要：Homeobox gene families encode transcription factors and regulate embryonic development programs. Although many homeobox genes are identified, the functions of double homeobox gene are remained largely unknown. In previous report, we firstly showed that mouse double homeobox gene, Duxbl, plays an important role in embryonic muscle development and muscle regeneration in adult damaged muscle. In this study, we identify the functions of Duxbl

during early embryonic development by in vitro differentiations of P19 embryonic carcinoma cells. During P19 myogenesis, Duxbl overexpression blocked the P19 myogenesis by inhibiting both MyoD and MyoG expressions and result in decreasing myosine heavy chain (MHC) expression in P19[Duxbl] cells compared with that of P19[control] cells. However, the muscle precursor marker genes, Pax3 and Pax7, were upregulated in P19[Duxbl] cells. During P19 neurogenesis, ectopic Duxbl expressions increased Nestin (neuron precursor marker) but decreased MAP2 (neurite marker) expressions in P19[Duxbl] cells. On the other hand, we try to establish rDuxbl-knockout rat by CRISPR-Cas9 system to study the in vivo functions of Duxbl, because mouse contains three non-continued paralog Duxbl genes but rat contains only one rDuxbl gene. The amino acid sequences of homeodomains of Duxbl in mouse and rat exhibited 95% identity. The Duxbl protein expressions were detected in brain, ovary and testis of both mouse and rat analyzed by self-made Duxbl antibodies. However, at present, we cannot obtain rDuxbl(+/-) founder among 17 transgenic rats. In advance, the rDuxbl knockout fertilized eggs were in vitro cultured to blastocyst stage. No rDuxbl knockout embryo was identified in these transgenic embryos. From these data, we suggest that rDuxbl was important for both early embryonic development and prenatal development. Therefore, we will establish conditional rDuxbl knockout rats to understand the physiological functions of Duxbl gene during mammal development.

英文關鍵詞： Double homeobox gene, Duxbl, Embryonic carcinoma cell, Gene knockout, Embryo development, Muscle repair and regeneration, in vitro differentiation, neurogenesis, homeodomain

闡明雙同源箱基因 *Duxbl* 對於哺乳類動物肌肉再生及胚胎發育的角色

目錄	I
中文摘要/關鍵字	II
英文摘要/關鍵字	III
前言、	1
研究目的、	1
文獻探討、	2
研究方法、	4
結果與討論 (含結論與建議)	5
參考文獻	11

哺乳動物發育是一個複雜的過程，尤其是組織的再生及早期胚胎發育的分子機制，我們對其了解更為有限。同源箱基因家族除了調控個體發育及器官形成之外，異常的表現也會造成疾病的生成。雖然目前已知的同源箱基因很多，但對於具有兩個同源箱區的雙同源箱基因在哺乳類動物的發育過程與再生物體的生理功能皆不清楚。我們發表第一個也是目前唯一發現的小鼠雙同源箱基因 *Duxbl*，*Duxbl* 蛋白參與小鼠胚胎時期肌肉發育與成鼠的受傷肌肉組織修復及再生，*Duxbl* 與人類 DUX4 蛋白的同源箱區相似度高達 67%，DUX4 被認為是造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症(FSHD)的主要候選基因。本研究目標延續過去的研究，以鼠類 *Duxbl* 基因來探討雙同源箱基因在哺乳類動物的早期胚胎發育及個體發育所扮演的角色，分別以細胞模式及基因剔除動物來達成研究目標。在細胞模式方面，以癌化的 P19 胚幹細胞進行體外肌肉細胞分化，研究結果顯示 *Duxbl* 異常表現會抑制 P19 細胞進行肌肉分化，減少表現 MHC 蛋白的 myotube 數量，同時肌肉母細胞標記基因 *MyoD* 與分化標記基因 *MyoG* 表現量降低，同時我們也發現肌肉前趨細胞標記基因 *Pax3* 及 *Pax7* 表現量皆增加了，尤其 *Pax7* 表現量增加較多；此結果與過去我們所發表的 *Duxbl* 蛋白抑制 C2C12 肌纖維母細胞分化結果相呼應；另外，我們以 RA 誘導 P19 細胞進行神經分化的過程中，當 *Duxbl* 過度表現後促進 Nestin 的表現，但抑制 MAP2 的表現，促使細胞維持在圓形增生的神經前驅細胞的狀態。在第六天分化時持續表現 *Duxbl* 的 P19[*Duxbl*] 細胞中有較高比例的細胞具有 NeuN 及 Nestin 的訊號。因此，我們推論 *Duxbl* 會促進 Nestin 的表現使神經前趨細胞增加，但是有抑制神經前趨細胞細胞分化為 neurite (MAP2) 的能力。另外，在產製 *Duxbl* 基因剔除鼠的研究上，我們產製 *rDuxbl* 基因剔除大鼠，因為大鼠只有一個 *rDuxbl* 基因並沒有小鼠上 *Duxbl* 基因三重複的現象。大鼠 *rDuxbl* 與小鼠 *Duxbl* 蛋白具有 80% 相似度，同源箱區胺基酸序列具有 93-95% 的相似度，大鼠 *rDuxbl* 蛋白表現分佈與小鼠 *Duxbl* 的表現分佈類似，主要在 brain, ovary 與 testis 可以偵測到 *Duxbl* 蛋白的表現，同時我們自製的 *Duxbl* 的抗體可以同時辨識大鼠與小鼠的 *Duxbl* 蛋白。但是以 CRISPR-Cas9 系統產製 *rDuxbl* 基因剔除大鼠，無法成功的產出 *rDuxbl*(+/-) 異型合子，推測可能剔除單一 *rDuxbl* 基因就造成胚胎死亡無法正常發育，進一步體外培養 *rDuxbl* 基因剔除受精卵至囊胚期，發現 Cas9 可以正確截切染色體 DNA，但無法成功地切除大片的 DNA，因此推測 *rDuxbl* 基因對於早期胚胎發育是必須的，未來將以條件式基因剔除大鼠來分析 *rDuxbl* 在發育與疾病相關的功能。

關鍵詞: 雙同源箱基因; *Duxbl*; 癌化的胚幹細胞; 基因剔除; 胚胎發育; 肌肉修復及再生; 體外分化; 神經分化; 同源箱區

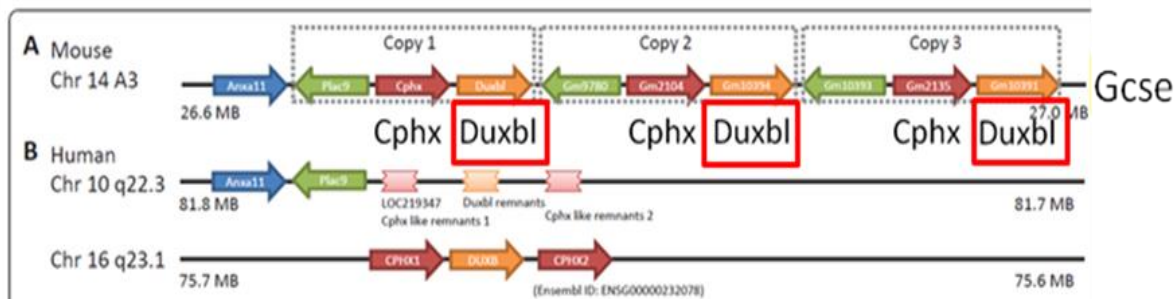
Abstract:

Homeobox gene families encode transcription factors and regulate embryonic development programs. Although many homeobox genes are identified, the functions of double homeobox gene are remained largely unknown. In previous report, we firstly showed that mouse double homeobox gene, *Duxbl*, plays an important role in embryonic muscle development and muscle regeneration in adult damaged muscle. In this study, we identify the functions of *Duxbl* during early embryonic development by *in vitro* differentiations of P19 embryonic carcinoma cells. During P19 myogenesis, *Duxbl* overexpression blocked the P19 myogenesis by inhibiting both *MyoD* and *MyoG* expressions and result in decreasing myosine heavy chain (MHC) expression in P19[*Duxbl*] cells compared with that of P19[control] cells. However, the muscle precursor marker genes, *Pax3* and *Pax7*, were upregulated in P19[*Duxbl*] cells. During P19 neurogenesis, ecotopic *Duxbl* expressions increased Nestin (neuron precursor marker) but decreased MAP2 (neurite marker) expressions in P19[*Duxbl*] cells. On the other hand, we try to establish *rDuxbl*-knockout rat by CRISPR-Cas9 system to study the *in vivo* functions of *Duxbl*, because mouse contains three non-continued paralog *Duxbl* genes but rat contains only one *rDuxbl* gene. The amino acid sequences of homeodomains of *Duxbl* in mouse and rat exhibited 95% identity. The *Duxbl* protein expressions were detected in brain, ovary and testis of both mouse and rat analyzed by self-made *Duxbl* antibodies . However, at present, we cannot obtain *rDuxbl*(+/-) founder among 17 transgenic rats. In advance, the *rDuxbl* knockout fertilized eggs were *in vitro* cultured to blastocyst stage. No *rDuxbl* knockout embryo was identified in these transgenic embryos. From these data, we suggest that *rDuxbl* was important for both early embryonic development and prenatal development. Therefore, we will establish conditional *rDuxbl* knockout rats to understand the physiological functions of *Duxbl* gene during mammal development.

Keywords: Double homeobox gene, *Duxbl*, Embryonic carcinoma cell, Gene knockout, Embryo development, Muscle repair and regeneration, *in vitro* differentiation, neurogenesis, homeodomain

前言、

本研究計畫延續過去的研究，探討鼠類 14A3 區雙同源箱基因 *Duxbl* 的功能分析，14A3 區的基因具有三重覆的現象，其中 *Cphx* 及 *Duxbl* 及 *Gcse* 為本計畫主持人過去已選殖並發表的三個新穎基因 (Huang et al., 2013, Li et al., 2006, Wu et al., 2010, Wu et al., 2014)，本研究計畫之 *Duxbl* 屬於同源箱基因家族，同源箱基因家族除了影響胚胎發育及器官形成之外 (Burglin, 2015)，異常的表現也會造成疾病的生成 (Boncinelli, 1997)，如人類 *DUX4* 基因異常表現造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症 (Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, FSHD) (Wijmenga, et al., 1992)。同源箱基因的研究報導很多，但雙同源箱基因的研究很少，所以過去被認為雙同源箱基因是屬於靈長類動物所特有的，我們過去所發表的兩篇 *Duxbl* 的報告，是第一個證明鼠類也有雙同源箱基因，同時完整的報導雙同源箱基因在個體發育上的表現分佈與可能功能，而人類同源箱基因 *DUX4* 被認為與 FSHD 疾病有關，*Duxbl* 與 *DUX4* 蛋白同源箱區具有 67% 的相似度，目前雙同源箱基因的正常生理功能並不清楚，本研究計畫將延續過去對於 *Duxbl* 基因的研究，分別以細胞與動物的模式，探討雙同源箱基因如何參與早期胚胎發育，及影響肌肉再生及眼球組織的發育及生殖細胞的發育，並了解異常的雙同源箱基因如何造成疾病的生成的分子機制，藉此 *Duxbl* 雙同源箱基因的研究，讓我們可以更進一步瞭解雙同源箱基因在哺乳動物發育上的正常生理功能，最終可以幫助我們了解整體哺乳類動物複雜的發育機制，及與這些基因異常表現所造成的人類疾病發展的關係。



圖一、小鼠 14A3 區重複序列上的基因群及相對應人類染色體 10 及 16 上的 orthologus。

研究目的、

根據我們過去的發表顯示，*Duxbl* 是第一個被發表且證實雙同源箱基因參與胚胎時期肌肉組織發育及成體受傷肌纖維的再生修復的雙同源箱基因，由我們未發表的結果顯示，*Duxbl* 在生殖細胞及胚幹細胞及眼球組織也有表現，顯示同源箱基因在個體發育上扮演重要角色，我們將分別以細胞及動物模式探討 *Duxbl* 雙同源箱基因在個體發育上正常的生理功能為何？

(A) 探討 *Duxbl* 在早期胚胎發育所扮演的角色

我們過去的研究顯示 *Duxbl* 除了參與肌肉發育之外，*Duxbl* 在胚胎幹細胞及 spermatogonia 及 oocyte 及神經細胞的表現量也很高，因此我們第三個研究主題是以 P19 (embryonic carcinoma cell) 為模式，探討 *Duxbl* 在早期胚胎發育的功能，P19 是一個研究早期胚胎發育的一個很好的組織培養系統 (McBurney, 1993)，許多的研究顯示 P19 可以體外分化為三種胚層細胞，與早期胚胎發育是相似的，同時也與胚幹細胞一樣，尤其是以 P19 為模式體外分化為肌肉細胞的過程中，參與的轉錄因子與訊號傳遞路徑與小鼠胚幹細胞及人類胚幹細胞的分化機制是一樣的 (Ryan et al., 2012)，也可以模擬早期胚胎肌肉發育的分子機制，因此我們將先以 P19 細胞為模式，以三個子目標探討 *Duxbl* 在早期胚胎發育所扮演的角色

子目標一：早期胚胎發育中，*Duxbl* 參與哪些胚層細胞的發育

子目標二：研究不同 *Duxbl* 表現量，如何影響肌肉細胞的發育及其分子機制

子目標三：研究不同 *Duxbl* 表現量，如何影響神經細胞的發育及其分子機制

(B)：建立大鼠 *Duxbl* 基因剔除鼠

雖然基因剔除是研究基因功能的最直接的方法，但是 *Duxbl* 基因位於 14A3 區具有不連續的三重覆序列，中間尚穿插 *Cphx* 基因，因此不管是傳統的基因剔除或條件式基因剔除都不容易同時將三個 *Duxbl* 基因剔除，又 *Duxbl* 在早期胚胎發育過程有高的表現，因此傳統基因剔除可能造成胚胎的死亡，另外由我們過去 *Cphx*-siRNA 基因轉殖鼠的研究經驗發現，*Cphx* 也具有三個不連續的相同基因，siRNA

無法完全的 knock down *Cphx* 基因的表現，只有前面兩胎子代數數目減少，之後生殖能力即恢復，因此我們將以基因剔除方式取代 siRNA 的方式研究 *Duxbl* 基因的功能，因為小鼠 *Duxbl* 有三個重覆序列，一個一個依序剔除 *Duxbl* 基因較費時與困難，而大鼠只有一個 *Duxbl* 基因，同時其同源箱區與小鼠 *Duxbl* 具有高達 95% 的相似度，因此我們計畫以大鼠 *Duxbl* 基因剔除鼠研究 *Duxbl* 基因的功能，因此我們選擇 CRISPR-Cas 系統 (Sternberg et al., 2014) 產製基因剔除鼠，將委託國家動物中心以 Cas9 系統產製 *Duxbl* 基因剔除大鼠，根據目前他們的結果顯示，Cas9 系統產製剔除鼠的成功率有 30-60%，因此三年內我們預計達成以下的目標：

第一年：分析大鼠 *Duxbl* 基因並產製 *Duxbl* 基因剔除大鼠

根據南科國家動物中心的實驗流程，先產製 *rDuxbl* 基因剔除 founder，經過與 wild type 大鼠交配，得到 *Duxbl*(+/-) 異型合子基因剔除鼠的大鼠，再將 *Duxbl*(+/-) 異型合子大鼠交配以獲得 *Duxbl*(-/-) 同型合子大鼠進行功能分析

子目標一：以生物資訊學及分子生物學建立大鼠 *Duxbl* 的基因結構

子目標二：分析大鼠 *Duxbl* 在大鼠發育過程的表現分佈

子目標三：產製 *Duxbl* 基因剔除大鼠的 founder 並交配繁殖出 *Duxbl*(+/-) 異型合子基因剔除大鼠

文獻探討、

雙同源箱基因家族(DUX: double homeobox gene):*DUX4* 及 *Duxbl*

(1).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)。同源箱基因異常的表現除了造成個體發育的異常之外，也會造成腫瘤及疾病的形成。

(2).**雙同源基因家族**:本研究中的 *Duxbl* 蛋白具有兩個同源箱區，屬於雙同源基因家族，過去的研究一直認為雙同源箱基因是屬於靈長類特有的基因，但並不清楚雙同源箱基因家族(DUX)對於個體發育或疾病的生成所扮演的角色，現在雖然因為生物資訊學的發達，分析 DUX 基因的演化，發現 DUX 家族包含 intronless 的 *DUX4* 及鼠類的 *Dux* 及有 intron 的 *DUXA*, *DUXB*, *DUXBL* 及 *DUXC* 次家族 (Leidenroth and Hewitt, 2010)，但目前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*，其他次家族是否真的存在並不清楚，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，致病分子機制不清楚，也沒有治療方法。以分子演化的角度分析，*Duxbl* 雖然不是 *DUX4* 的 orthologue，*DUX4* 是 *Duxbl* 基因的 retrogene paralogue，但 *Duxbl* 同源箱區與人類 *DUX4* 有高達 67% 的相似度，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 (非 pseudogene)，由於人類 *DUX4* 表現量太低不易偵測 *DUX4* mRNA 或蛋白的表現，因此目前有關雙同源箱基因所具有的正常生理功能的研究，除了 Kawazu 等人發現 *Duxbl* 可能與 thymocyte 的發育有關之外 (Kawazu et al., 2007)，完整的基因結構與表現分佈，主要來自於我們過去發表的 *Duxbl* 的研究結果，根據我們目前的研究結果顯示雙同源箱基因參與胚胎發育時期體腔骨骼肌的發育與成體骨骼肌的修復作用，另外 *Duxbl* 與生殖細胞的發育及眼球與眼外肌的發育也有關 (our unpublished data)，而 *Duxbl* 異常的表現也會造成肌肉發育的異常，因此研究鼠類 *Duxbl* 將可以解答雙同源箱基因的正常功能，及其異常表現可能造成的疾病的分子機制。

(3). Comparison of *Duxbl* and *DUX4* in myogenesis

研究顯示許多 FSHD 病人肌肉組織特有的異常表現的基因都是受 MyoD 調控的下游基因或影響 MyoD 活性及其它肌肉發育相關分子 (Winokur et al., 2003)。因此 *Duxbl* 異常表現所影響的分子與 FSHD 異常表現的分子是相似的，但 *DUX4* 在人類或小鼠肌纖維母細胞上的功能分析的結果並不一致，有些研究指出人類 *DUX4* 造成小鼠 C2C12 細胞凋亡同時抑制 *MyoD* 的表現進而抑制分化 (Bosnakovski et al., 2008b)，另外也有報告指出 *DUX4* 另外的 homolog *DUX4c* 促進人類肌纖維母細胞增生 (Ansseau et al., 2009)，與我們的結果一致，但也有不同的研究指出 *DUX4c* 造成小鼠 C2C12 細胞凋亡與抑制 *MyoD* 的表現 (Bosnakovski et al., 2008a)，由於不同物種其基因組成的差異，因此跨物種的研究基因功能，可能無法反應真正的生理機制，但是在以肌纖維母細胞為模式探討 *Duxbl* 或 *DUX4* 的功能分析上都可以發現雙同源箱基因異常表現影響肌肉的分化作用，但 *DUX4* 或 *Duxbl* 所影響的

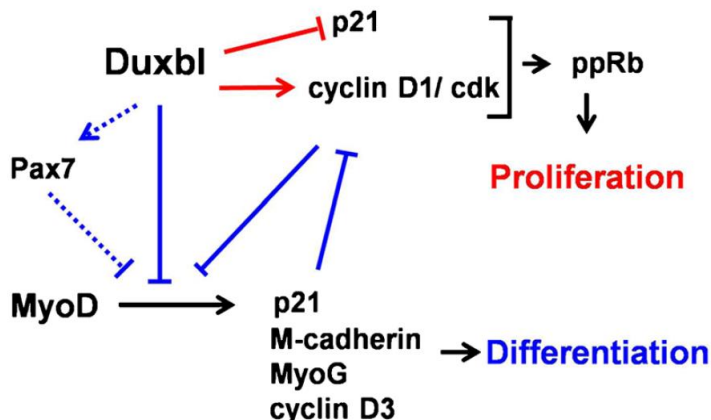
目標基因卻因研究方式不同，所用的細胞來源人類或小鼠細胞而有不同，因此本研究直接以小鼠系統研究雙同源箱基因 *Duxbl* 的功能，才能反應雙同源箱基因的正常生理功能。

鼠類雙同源箱基因 *Duxbl* 相關研究:(Wu et al., 2010; 2014; unpublished data)

Duxbl 相關研究的發表有三篇，其中有兩篇是我們發表的

(1).**基因結構與表現分佈(Wu et al.,2010)**:根據我們對小鼠 *Duxbl* 的研究顯示，*Duxbl* 基因在 14A3 染色體上具有三個不連續的 paralogus，*Duxbl* 基因結構上具有 intron 的結構，*DUX4* 是大約一百個直接重複序列，沒有 intron，因此不易偵測 *DUX4* mRNA 或蛋白表現，但 *Duxbl* 可以明確的分析 *Duxbl* mRNA 及蛋白的表現分佈，而根據 *Duxbl* 在小鼠發育過程的表現分佈(Table I)也顯示雙同源箱基因有其正常的生理功能，因此小鼠 *Duxbl* 的研究可以了解雙同源箱基因在個體發育上的功能。

(2). ***Duxbl* 細胞功能分析: *Duxbl* promote myoblast proliferation and abolished cell differentiation (Wu et al., 2014)** 在小鼠胚胎時期肌纖維發育過程，*Duxbl* 表現在分化的肌細胞，同樣的我們也發現分化後的 C2C12 細胞 *Duxbl* 基因的表現增加，與活體的分析是一樣的，而分離並培養人類的肌纖維細胞也發現，分化後的肌細胞 *DUX4* 表現量增加，再次證明雙同源箱基因 *Duxbl* 及 *DUX4* 參與 myogenesis 過程，因此我們以 C2C12 肌纖維母細胞為模式探討 *Duxbl* 異常表現對於 C2C12 分化的影響，C2C12 是由小鼠衛星細胞分離建立的細胞株，體外培養液營養充足時 C2C12 屬於增生期，當血清減少時 C2C12 停止細胞週期進入分化時期，細胞排列且融合形成多核的肌小管，*Duxbl* 過量表現促進 C2C12 細胞增生，但抑制 C2C12 細胞分化，其分子機制如下圖二所示:



圖二、過度表現 *Duxbl* 之 C2C12 細胞，*Duxbl* 促進細胞增生與抑制細胞分化之分子機制圖。(Wu et al., 2014)

Duxbl 藉由活化 cyclinD1 促進細胞增生，*Duxbl* 同樣會促進 10T1/2 及 Sol8 (慢肌母纖維細胞)增生，*Duxbl* 微量增加 *MyoD* 的表現但卻抑制 *MyoD* 的活性，*MyoD* 下游基因(*M-cadherin*, *MyoG*, *p21*, *cyclin D3*)的表現都被抑制，因此造成細胞無法形成正常肌小管，另外不管增生或分化期，*Pax7* 的表現也都微量增加，相反的 *MyoG* 的表現被抑制，因此 *Duxbl* 過量表現的 C2C12 細胞呈現類似活化增生期的衛星細胞同時表現 *Pax7/MyoD* 但沒有 *MyoG* 的表現，根據過去的報導指出 *Pax7* 會抑制 *MyoD* transactivation 的活性，但當 *MyoD* 下游的 *MyoG* 基因開始表現後，*MyoG* 直接影響 *Pax7* 的表現，因此 *Pax7* 與 *MyoG* 呈現互相抑制的現象(Olguin, et al., 2007)，因此在我們目前的研究中，*Duxbl* 可能直接或間接促進 *Pax7* 的表現(圖二虛線)，而 *Pax7* 的增加也可能是影響 *MyoD* 的活性的原因之一，但 *Duxbl* 如何抑制 *MyoD* 的活性其分子機制仍需進一步的研究。

P19 embryonal carcinoma (EC) cells

本研究計畫以 P19 為模式細胞研究 *Duxbl* 對於早期胚胎發育的影響，P19 細胞是由 teratocarcinoma(畸胎瘤)所分離出來的細胞株(McBurney and Rogers, 1982)，P19 細胞與胚幹細胞相似，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(McBurney, 1993)，尤其在心肌與骨骼肌發育

上的研究發現(Skerjanc, 1999)，以 P19 體外分化為肌肉細胞的分子機制上與早期胚胎發育是相似的，特別是將 P19 誘導為中胚層及心肌或骨骼肌的過程，一些相關因子表現的先後順序與胚胎發育是一樣的，目前常用的分化方式是將 P19 懸浮培養使其形成 EB(embryo body)，此時可誘導出中胚層細胞表現出 Brachyury T 基因，在 EB 培養液中加入 0.5-1% DMSO 可以誘導心肌及骨骼肌的分化，誘導 4-5 天時可以誘導出 premyogenic mesoderm cells，分化 8-9 天 myoblast 開始出現，第九天出現分化的骨骼肌細胞，以 P19 為模式進行肌纖維的分化其分子機制與 mES 及 human ES 相同，因此 P19 是研究體外肌肉組織分化很好的模式，可以取代早期胚胎，研究基因在早期肌肉分化的功能及探討其分子機制，將有助於將來以胚幹細胞進行體外分化為肌肉細胞作為細胞治療的參考。同時 P19 進行神經分化的研究發表很多，也是一個很好的神經細胞體外分化的模式細胞。以 P19 進行神經分化所產生的 neuroepithelial-like germinal cells 及 postmitotic neurons 在功能及型態上都與哺乳動物中樞神經系統相類似(Monzo et al., 2012)。

Genome editing for gene knockout: (CRISPR-Cas9)

傳統基因剔除或條件式基因剔除是研究基因功能最直接的方式，一般是改造胚幹細胞(embryonic stem cell:ES)的基因，再植回囊胚，產製基因剔除鼠，但篩選及改造 ES 細胞的時間較長又需插入一些額外的篩選基因如 neomycine 的基因，因此得到基因剔除鼠的時間較長，最近有兩種新的改造基因的方式被發表，分別是 Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)及 Clustered, Regularly Interspaced Palindromic Repeat Associated (CRISPR-Cas) proteins 系統，TALEN 系統由 site-specific binding protein 及 restriction endonuclease FokI 融合蛋白所組成(van der Oost, 2013; Wang et al., 2014)，CRISPR-Cas 則是利用 20 個 nucleotide 長度的 site-specific guide RNA(sgRNA)將 Cas9 nuclease 帶至目標基因，TALEN 與 CRISPR-Cas 系統所使用的 nuclease 可以將目標基因雙股 DNA 切斷，細胞為了生存會進行修補 DNA 的動作，首先，將兩個斷掉的 DNA 端點再接回去，進行所謂的 non-homologous end joining (NHEJ)，但 NHEJ 容易出錯造成 insertion 或 deletion 破壞目標基因而造成目標基因沒有功能，另外細胞也可以進行 homologous recombination (HR)，研究人員可以設計帶有篩選基因或 insertion, deletion 或 single base mutation 的目標基因的載體送入細胞，藉由 HR 修復的機制，造成目標基因的改造，若改造的目標基因同時帶有 loxP 或 flp 序列，則可以建立條件式基因剔除細胞，所以利用 CRISPR-Cas 系統改造受精卵細胞的目標基因，再植回母鼠即可產製基因剔除或條件式基因剔除小鼠，由 CRISPR-Cas 系統得到一般或條件式基因剔除鼠的 founder 時間大約 6 個月，所需時間較短，而一般以 ES 細胞產製基因剔除鼠得到異合子的子代，順利的話可能需要 10 個月，受限於 ES 的品質，影響得到基因剔除鼠的機會與時間，因此本計畫將以 CRISPR-Cas 系統委由國家動物中心進行大鼠 *Duxbl* 基因剔除鼠的產製，小鼠 *Duxbl* 基因在 14A3 染色體上具有三個不連續的 paralogus (*Duxbl-1*, *Duxbl-2*, *Duxbl-3*)，但大鼠只有一個 *Duxbl* 基因，鼠類 *Duxbl* 之同源箱區的氨基酸序列有 95% 的相似度，因此我們將剔除大鼠 *Duxbl* 基因研究雙同源箱基因對於個體發育的影響。

研究方法、

(1) 探討 *Duxbl* 在早期胚胎發育所扮演的角色

【子目標 1】P19 細胞分化為中胚層、外胚層、內胚層 *Duxbl* 基因之表現分佈？

研究方法：

(1).中胚層分化:第零天: 將 4.5×10^5 P19 細胞培養於 *E. coli* 的培養盤懸浮培養使細胞形成 EB，在 EB 的培養液中加入 1% DMSO 及 3nM RA，經過 4 天 EB 的培養後，第四天將 EB 培養在細胞培養盤貼盤培養，第五天及第九天收細胞萃取 RNA 以 RT-PCR 或 real-timePCR 分析 premyogenic mesoderm 基因:*Pax3*, *Gli2*, *Meox1*, *MRFs* 及 *Duxbl* 的表現，另外也收集第二天及第四天的 EB 細胞萃取 RNA 並分析 *Brachyury T* 及 *BMP-2/4* 中胚層的標記基因的表現。

(2).外胚層: 神經細胞的分化(McBurney et al., 1988): 1×10^5 P19 細胞懸浮培養 4 天，培養液為 aMEM 及 5% FCS 並添加 500nM RA，4 天後以 trypsin 將 EB 打散，放置於 poly-L-lysine coating 的細胞培養盤以 10% FCS/aMEM 培養，培養五天後觀察是否神經細胞出現並收集細胞萃取 RNA 或以 Nestin (neuron precursor cell marker)或 MAP2 (neurite marker)與 *Duxbl* 抗體進行共同螢光免疫染色，可以追蹤 *Duxbl* 表現於哪個階段的神經細胞。

(3).內胚層的分化:10⁵ P19 細胞貼盤培養，以 100nM RA 培養 4 天，再以無 RA 條件培養三天，再收集細胞萃取 RNA 進行 RT-PCR 分析 endoderm 的標記基因 *GATA-6* 及 *Troma-1* 的表現，另外也分析 P19 分化為 endoderm cells 其 *Duxbl* 基因的表現是否增加或減少

【子目標 2】改變 *Duxbl* 基因的表現量對於 P19 分化為骨骼肌的影響及其分子機制為何？

研究方法：

(1).以現有的 *Duxbl*-shRNA(short hairpin RNA)表現載體 sh*Duxbl* vector 與 *Duxbl*-V5 表現載體共轉染至細胞，並收集細胞萃取蛋白以 V5 抗體進行 Western blot 分析 sh*Duxbl* 抑制 *Duxbl* 表現的比例，由我們過去的研究顯示，兩個 sh*Duxbl* 片段中，其中一個片段確實抑制 *Duxbl* 表現的效果較好，以此 sh*Duxbl* 與帶有 puromycin 抗性的載體共同轉染至 P19 細胞以 puromycin 篩選 10 天得到 P19[sh*Duxbl*]或 P19[shcontrol]細胞，先分析細胞的增生是否受影響，再根據中胚層分化方法進行骨骼肌的分化與各分化時期標記分子的分析，比較 P19[sh*Duxbl*]與 P19[shcontrol]的差異，進而瞭解 *Duxbl* 表現減少影響哪個時期的細胞分化及可能影響的分子為何？

(2) 以現有的 *Duxbl*-v5 表現載體轉染至 P19 細胞以 500ug/ml G418 篩選 2 週後，得到的 P19[*Duxbl*] clone 與 P19[control]，先分析細胞的增生速度，再根據中胚層分化方法進行骨骼肌的分化與各分化時期標記分子的分析。

【子目標 3】：改變 *Duxbl* 基因的表現量對於 P19 分化為神經細胞的影響及其分子機制為何？

研究方法：

(1). 以 P19[sh*Duxbl*]與 P19[shcontrol]進行神經細胞的分化，參考【子目標 1】方法 2，進而瞭解 *Duxbl* 影響哪個時期的細胞分化及可能影響的分子為何。

(2). 以 P19[*Duxbl*] clone 與 P19[control] 進行神經細胞的分化，參考【子目標 1】方法 2，進而瞭解 *Duxbl* 影響哪個時期的細胞分化及可能影響的分子為何。

預計結果:根據我們目前的結果顯示，P19 神經分化過程，*Duxbl* 表現的時間點與 *MAP2* 一致，但 *Duxbl* 過度表現確使表現 Nestin 的細胞數增加，但抑制 *MAP2* 的表現。我們將延長神經分化的時間，分析是否 *Duxbl* 使神經細胞維持在 neuron precursor cell 因而抑制進一步的神經分化。

(2). 分析大鼠 *Duxbl* 基因並產製 *Duxbl* 基因剔除大鼠

研究方法:

與國家動物中心聯繫討論基因相關資訊，設計兩條辨識 rat *Duxbl* genomic DNA sgRNA 片段以 in vitro transcription 的方式產製及純化上述之 sgRNA 及 Cas9 WT mRNA 同時注射 sgRNA_1 + sgRNA_2 + Cas9 WT mRNA，預計剔除 7.2K 之 DNA 片段 (與國家動物中心討論設計)，委託國家動物中心進行 SD 大鼠原核顯微注射及進行轉殖鼠的基因型分析，預計獲得 3 隻 founder (heterozygous 或 homozygous)，後續將進行育種，首先獲得 *Duxbl*(+/-)異型合子子代進行觀察分析 *Duxbl*(+/-)異型合子大鼠外型是否正常，及 *Duxbl*(+/-)異型合子大鼠生殖能力是否受影響。在等待產製基因剔除鼠的過程我們也將分析大鼠 *Duxbl* 基因在各個組織器官的表現分佈與小鼠 *Duxbl* 的表現分佈是否有差異，作為將來基因剔除大鼠分析的參考依據。

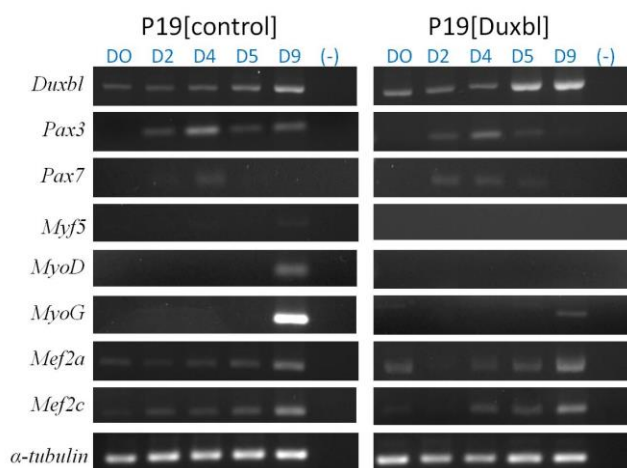
設計兩條辨識 rat *Duxbl* genomic DNA sgRNA 片段:分別為 sgRNA_1: CATT CCCGGGACATAGTGCTTGG (on exon2) 及 sgRNA_2: TAACGGAACAGCTGCTGGTGGG (on exon7)，預計剔除 7.2K 之 DNA 片段。由於 *Duxbl* 可能在胚胎發育時期會表現，因此有可能我們得到的 Founder 為 *Duxbl*(+/-)異型合子，因此我們將繁殖出 *Duxbl*(+/-)異型合子子代，先進行分析。結果如下

結果與討論:

本研究計畫延續去年的計畫，我們過去一年以 P19 細胞為模式進行體外肌肉細胞的分化，發現 *Duxbl* 在分化的第九天表現量增加，同時也是肌肉分化的標記基因 *MyoD* 與 *MyoG* 表現的時間點，代表 *Duxbl* 參與胚胎肌肉發育或出生後的肌肉修補的機制是一樣的，都是與 *MyoG* 表現的時間點一致，另外我們也發現，*Duxbl* 異常表現也會抑制 P19 進行肌肉分化，*MyoD* 與 *MyoG* 的表現會降低(Fig. 1)，與過去我們所發表的 *Duxbl* 抑制 C2C12 細胞分化結果相呼應；同時我們也發現 muscle precursor marker

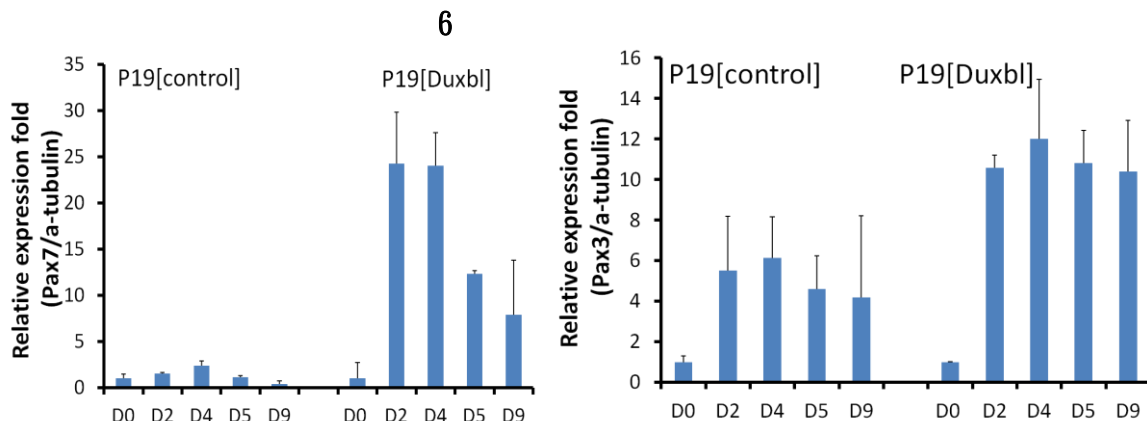
gene *Pax3* 及 *Pax7* 表現量增加了，尤其 *Pax7* 表現量增加較多(Fig. 2)，以 MHC 進行免疫螢光染色也發現，*Duxbl* 過度表現抑制 myotube 的形成(Fig. 3)；另外我們以 RA 誘導 P19 神經分化的過程中，神經前驅細胞的標記基因 *Nestin* 的表現在第二與四天表現較高，而神經的標記基因 *MAP2* 則在第四天開始增加第六天大量增加，*Duxbl* 基因的表現在前四天 RA 誘導時減少，第六天 *MAP2* 開始表現後 *Duxbl* 的表現也有微量的增加，當 *Duxbl* 過度表現後，*Nestin* 的表現由第四天增加到第六天明顯的增加，但 *MAP2* 的表現在第六天卻有被抑制的現象(Fig. 4)，由結果判斷，*Duxbl* 過度表現促進 *Nestin* 的表現但抑制 *MAP2* 的表現，促使細胞維持在神經前驅細胞的狀態。以 Neurol Nuclei (NeuN)抗體進行螢光染色染神經細胞核的實驗也發現，第六天分化時期，*Duxbl* 過度表現之 P19[*Duxbl*]中有較高比例的細胞具有 NeuN 的訊號 (P19[*Duxbl*]:P19[control]=18.6%: 13.8%)(data not shown)，分化九天以 *Nestin* 進行染色分析，很清楚的 P19[*Duxbl*]細胞染到 *Nestin* 訊號較 P19[control]組來的多，由明視野也發現 P19[*Duxbl*]具有較多圓形增生細胞(Fig. 5)，因此我們推論 *Duxbl* 促進 *Nestin* 的表現使 neuron precursor 細胞增加，但抑制 neuron precursor 細胞分化為 neurite (*MAP2*)的能力。我們將進一步延長神經細胞分化的時間軸，並分析 *Duxbl* 增加 P19 細胞分化為 neuron precursor 細胞之外，是否抑制成熟神經細胞的分化。另外在產製 *Duxbl* 基因剔除鼠的研究上，我們發現大鼠 *Duxbl* 基因位於十六號染色體上，其下游是 *Cphx* 基因，再下游有與生殖相關的 *Plac9* 基因。此段染色體所包含的基因與小鼠 14A3 區一致，但沒有三重複的現象(Fig. 6)，同時大鼠 *Duxbl* 的基因結構與小鼠很類似，因此以 *Duxbl* 基因剔除大鼠進行 *Duxbl* 功能分析將較直接與容易些，大鼠 *Duxbl* 與小鼠 *Duxbl* 蛋白具有 80%相似度(Fig. 7)，同源箱區胺基酸序列具有 93-95%的相似度(Fig. 8)，根據 database 上的大鼠 *Duxbl* 基因的 cDNA 序列，我們設計 primer 進行 PCR 並將 PCR 得到的片段進行序列分析，與 cDNA 序列比對發現是一樣的，因此我們證明大鼠 *Duxbl* 基因確實會表現且在 brain, ovary 與 testis 都有表現與小鼠 *Duxbl* 的表現分佈類似(Fig.9)，同時以我們自製的辨識小鼠 *Duxbl* 的抗體分析大鼠 *Duxbl* 蛋白的表現，將抗體先以蛋白的同源箱區進行中和反應再進行 western blot，由我們初步的結果顯示我們自製的 *Duxbl* 抗體可以辨識大鼠與小鼠的 *Duxbl* 蛋白，另外在 ovary 也發現 *Duxbl* 訊號(Fig.10)，未來將繼續分析大鼠的表現分佈，另外在以 CRISPR-Cas9 產製 *rDuxbl* 基因剔除大鼠方面，根據國家動物中心所設計的兩個 sgRNA 片段與 Cas9 mRNA 共同打入受精卵後，預計將在 *rDuxbl* 基因上產生兩個切點，若成功切兩刀，將可切除 7.2kb 的 *Duxbl* 基因片段，但分析 17 隻基因轉殖鼠都沒有發現 *rDuxbl*(+/-) heterozygote 的 founder 產出(Fig.11)，推測可能 *rDuxbl* 對於胚胎發育很重要，因此 *rDuxbl* 基因剔除造成 embryonic lethal，因此進一步培養 *rDuxbl* 基因剔除的受精卵至囊胚期，分析不同時期的早期著床前胚胎，還是沒有剔除 7.2kb DNA 片段的 heterozygote 胚胎存在，但是證明 Cas9 可以切動 *rDuxbl* DNA，兩個切點都會切，但沒有發現兩個切點同時截切於同一條 allele 上的胚胎存在，我們推測 *rDuxbl* 除了影響胚胎發育之外，對於早期著床前胚的發育也是很重要的，將來我們計畫產製條件式 *rDuxbl* 基因剔除鼠，再與組織專一性表達之 Cre 老鼠交配繁殖，產製細胞或組織專一性 *rDuxbl* 基因剔除鼠，以進行 *rDuxbl* in vivo 生理功能分析，進而瞭解雙同源箱基因在個體發育上所扮演的角色。

(1). P19 細胞肌肉分化過程，*Duxbl* 的表現分佈及其它肌肉發育相關因子的表現分佈，過度表現 *Duxbl* 對於 P19 肌肉分化相關因子的影響。



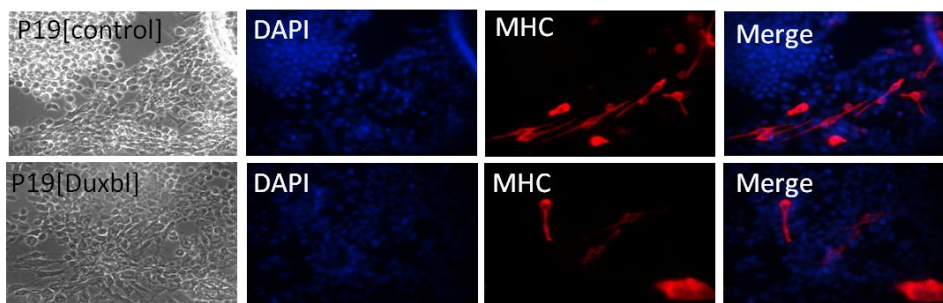
(Fig. 1) P19[control]細胞進行體外肌肉分化時，肌肉前趨細胞標記基因 *Pax3* 及 *Pax7* 分別在第二及第四天開始出現，而第五天肌纖維母細胞標記基因 *MyoD* 開始表現，而分化的標記基因 *MyoG* 第九天開始大量增加，而 *Duxbl* 基因在胚幹細胞增生時期及分化時期都有表現，但在第九天表現量與 *MyoD* 及 *MyoG* 一樣都增加，推測早期胚胎肌肉發育過程 *Duxbl* 參與肌細胞的分化，肌肉分化時期 *Duxbl* 表現明顯的增加，表現的時間點與 *MyoD* 及 *MyoG* 相同。而過量表現 *Duxbl* 的 P19[*Duxbl*]細胞，*MyoD* 與 *MyoG* 表現明顯被抑制了，但肌肉前趨細胞標記基因 *Pax7* 的表現量卻有微量增加了，其它 *MyoD* 的 coactivator MEF2 家族的基因表現不受 *Duxbl* 影響，因此我們推測以 P19 為模式進行胚胎肌肉分化的過程，*Duxbl* 異常的表現抑制 *MyoD* 與 *MyoG* 表現因而抑制肌肉分化。

(2). P19 細胞進行肌肉分化過程，*Duxbl* 增加肌肉期趨細胞標記基因 *Pax7* 及 *Pax3* 的表現



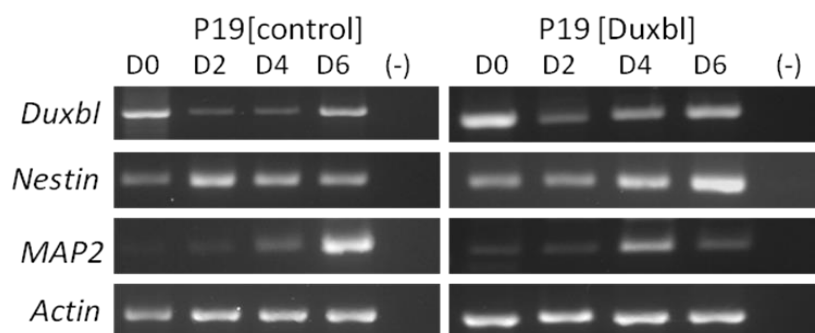
(Fig. 2) P19 肌肉分化過程中，分化第二天及第四天 *Pax3* 及 *Pax7* 表現增加，第五天 *Myo* 開始表現後，*Pax3* 及 *Pax7* 表現開始減少，*Duxbl* 過度表現的 P19 細胞，明顯的在第二及第四天 *Pax7* 及 *Pax3* 的表現量的增加遠比對照組 P19 細胞高，又 *Pax7* 表現增加的倍數又比 *Pax3* 來的高。

(3). P19 細胞進行肌肉分化過程，*Duxbl* 抑制肌肉最終分化的型態圖



(Fig. 3) P19 細胞進行肌肉分化九天後，以肌肉最終分化的標記基因 MHC (myosin heavy chain) 抗體進行免疫染色，P19[*Duxbl*]所染到的 MHC 訊號比 P19[control]少，P19[*Duxbl*]進行最終分化為 myotube 的數目很明顯被抑制了

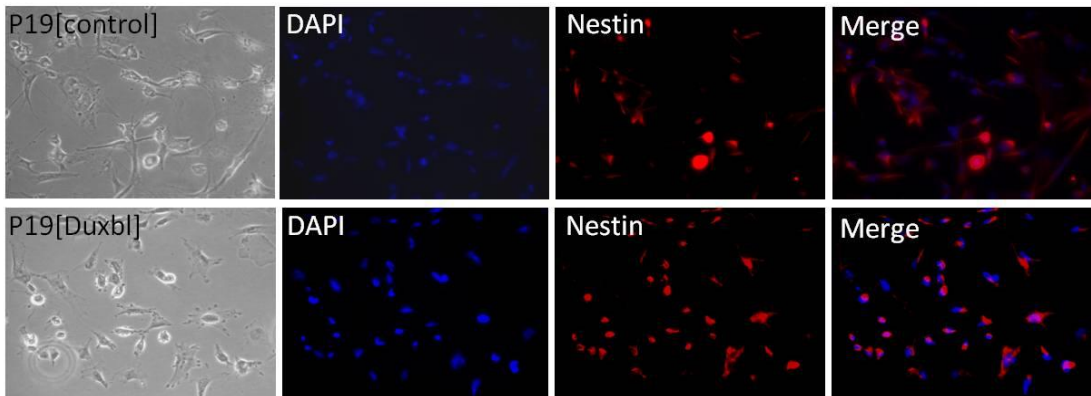
(4). P19 神經分化過程中 *Duxbl* 基因的表現分佈，及過度表現 *Duxbl* 對於 P19 神經分化的影響



(Fig. 4) P19[control]以 RA(retinoic acid)誘導神經細胞分化，Neuron precursor cell 的標記基因 *Nestin* 由第二天增加到第四天，neurite 標記基因 *MAP2* 的表現第四天開始增加第六天大量增加，同樣的

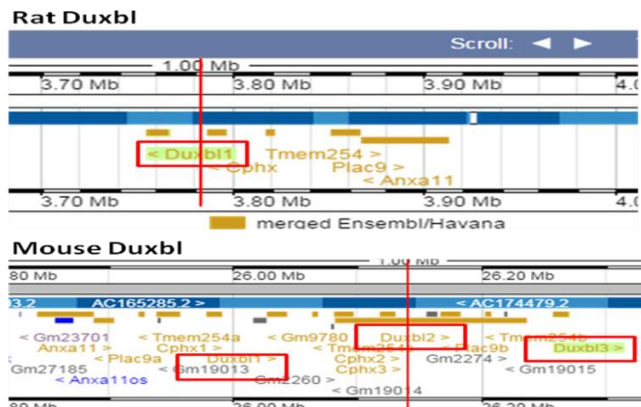
Duxbl 的表現第六天開始增加，*Duxbl* 過度表現的 P19[*Duxbl*]細胞 *Nestin* 基因的表現由第二天增加到第六天，但 *MAP2* 在第六天的表現卻被抑制了，推測 *Duxbl* 促進 *Nestin* 的表現，使神經細胞維持在 neuron precursor cell 時期，但抑制神經細胞的分化及 *MAP2* 基因的表現。

(5). P19 神經分化過程中 *Duxbl* 過度表現促使表現 *Nestin* 基因的 neuron precursor cell 數目增加



(Fig. 5) P19[contro]細胞及 P19[Duxbl]細胞進行神經細胞分化後第九天，以 neuron precursor cell 標記基因 *Nestin* 進行免疫螢光染色，*Duxbl* 過度表現造成 P19[Duxbl]組所染到的 *Nestin* 訊號比 P19[control] 組多，同時由明視野發現 P19[Duxbl]組別的細胞大部分維持在圓形增生細胞的型態，而 P19[control] 組可以看到延展開的細胞。

(6). Rat *Duxbl* gene: genomic DNA 分析



(Fig.6) 大鼠 *Duxbl* 位於 16 號染色體上，只有一個 *Duxbl* 基因，也只有一個 *Cphx* 基因，相反的小鼠有三個 *Duxbl* 與 *Cphx* 基因，因此我們建構大鼠 *Duxbl* 基因剔除鼠以研究 *Duxbl* 的功能。

(7). Mouse *Duxbl* 與 rat *Duxbl* 蛋白組成分析

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
565 bits(1455)	0.0	Compositional matrix adjust.	282/353(80%)	302/353(85%)	3/353(0%)
Query 1	MDLNCTGGLLEKEARRRRRIILNQSQKDTLRVWFEKPNPDLATRGHLAKKLGISESQIMT				60
Sbjct 1	M+L+C+ GLLEKEARRRRRIIL QSQKDTLRVWFEKPNPDLATRGHLAK+LGISESQIMT				60
Query 61	WFQKHKRIRKQVEFECCESEESQEQGQDKPRVKEAGRSRTHFTKQIDILIEAFEKNRFPFG				120
Sbjct 61	WFQKHKRIRKQ EF CCSEESQEQ QDKPRVKEA RSRTHFTKQ DILIEAFEKNRFPFG				120
Query 121	IVTREKLAQETGIPESRIHIWFQNRARRHPDPKQGRATRSHPPESSQCPAQKTTGQLAPS				180
Sbjct 121	IVTREKLAQ+TGIPESRIHIWFQNRARRHPDP Q T+ T HPP+SSQ P QKT G+LAPS				180
Query 181	KDPTSSCSVILPLSPHPPTNGPLDLSRGRQKQLPETTVLQPSQVVRGDDQNP SLFIDH				240
Sbjct 181	KTLTSSASVILPLSPHPPTNGPLDLSKGRQKQLPGTTLLQSSQVVRGDDQNP N- -KGH				238
Query 241	LSEVKSPEGEKEGFHTQAPLQLPIQKRGHNPSENSGLSVPPLEDSTQVSAVNQHFRRKPDQK				300
Sbjct 239	LS +PGE +GFH+Q PLQL Q RGHNP E+ GL+VP LED TQV AVNIQHFRK DQ				297
Query 301	DLAFLQHWDEWFGSMLAEWMPDKGYWAVKTDLHPWQAQLLQLLYVSEQTDQTP				353
Sbjct 298	D +FLQHWDEWF SMLAEWMPDK YW+ K +LHPWQ QL QL VS Q QTP				350

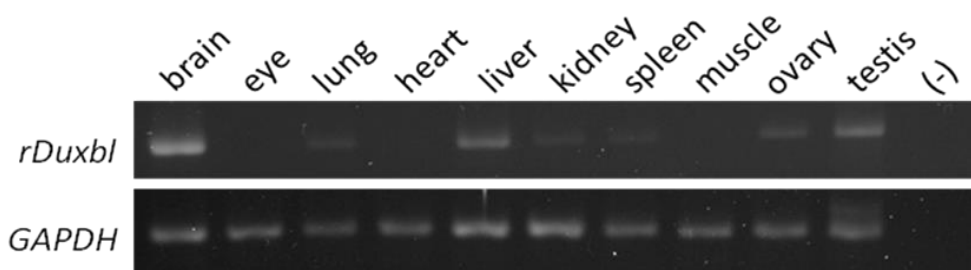
(Fig.7) mouse Duxbl 由 350 個胺基酸所組成，rat Duxbl 由 357 個胺基酸組成，胺基酸序列具有 80% 的相似性。

(8). Mouse Duxbl 與 rat Duxbl 同源箱區的比較

		Helix 1	Helix 2	Helix 3	
Rat Duxbl- H1	1	ARRRRRIILNQSQKDTLRVWFEKNPNPDLATRGHLAKKLGISESQIMTWFKHRKIRKQVE			60
Mouse Duxbl- H1	1	ARRRRRIILTQSQKDTLRVWFEKNPNPDLATRGHLAKELGISESQIMTWFKHRKIRKQAE			60
		*****	*****	*****	*
		*****	*****	*****	*
		*****	*****	*****	*
		Helix 1	Helix 2	Helix 3	
Rat Duxbl- H2	1	AGRSRTHFTKFKQIDILIEAFEKNRFPPIVTRKLAQETGIPESRIHIWFQNRARRHPDPK			60
Mouse Duxbl- H2	1	ARRSRTHFTKFKQTDILIEAFEKNRFPPIVTRKLAQQTGIPESRIHIWFQNRARRHPDPG			60
		*	*	*	*
		*	*	*	*
		*	*	*	*

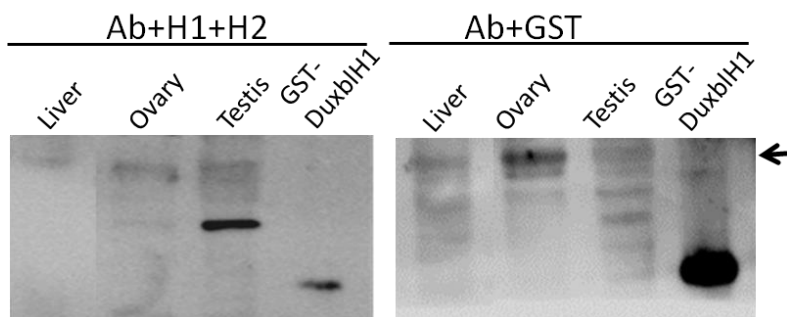
(Fig. 8) rat Duxbl 同源箱區 H1 及 H2 與 mouse Duxbl 比對發現具有分別具有 95%(H1)及 93% (H2)的相似度。

(9).大鼠 *Duxbl* 基因在成熟組織的表現分佈



(Fig.9) 根據(ENSRNOT00000052224)序列，設計 exon1 及 exon5 的 primer，以大鼠不同屍體組織 RNA 進行 RT-PCR，發現大鼠 *Duxbl* 基因在 brain, ovary, testis 都有表現，將 PCR 片段進行序列分析與 cDNA 的序列比對是一樣的。證實大鼠 *Duxbl* 在成體組織有表現。

(10). 以自製 anti-mDuxbl 抗體分析大鼠 *Duxbl* 蛋白表現



(Fig. 10) 以我們自製辨識小鼠 *Duxbl* 的抗體分別與 GST(Ab+GST)或與 homeodomain I 及 II(Ab+H1+H2) 中和反應後，萃取大鼠組織蛋白進行 western blot 分析 *Duxbl* 蛋白表現，GST-*Duxbl*H1 是抗體會辨識的正對照組，經過 H1/H2 的中和反應後，明顯訊號幾乎消失，而 *Duxbl* 的訊號也消失了(箭號)，由初步結果顯示，我們的抗體可以辨識小鼠與大鼠 *Duxbl* 蛋白，且在大鼠 ovary 有 *Duxbl* 蛋白表現。

(11). rDuxbl 基因剔除大鼠結果：

與國家動物中心聯繫討論基因相關資訊，設計兩條辨識 rat *Duxbl* genomic DNA sgRNA 片段以 in vitro transcription 的方式產製及純化上述之 sgRNA 及 Cas9 WT mRNA 同時注射 sgRNA_1 + sgRNA_2 + Cas9 WT mRNA，兩條辨識 rat *Duxbl* genomic DNA sgRNA 片段：分別為 sgRNA_1: CATT CCCGGGACATAGTGCTTGG (on exon2) 及 sgRNA_2: TAACGGAACAGCTGCTGGTGGG (on exon7)，預計剔除 7.2K 之 DNA 片段 (與國家動物中心討論設計)，委託國家動物中心進行 SD 大鼠原核顯微注射及進行轉殖鼠的基因型分析，結果如下：

基因名稱：rDuxbl1

產製使用品系：大鼠 / SD 品系

注射材料組合：Cas9 + rDuxbl1 sgRNA1+rDuxbl1 sgRNA2

1. *rDuxbl* 基因剔除鼠產製紀錄：

批次	注射後存活胎數	注射材料濃度 (ng/ul)	移植胎數	出生數	基因改造鼠隻數	sgRNA1 site cut	sgRNA2 site cut	sgRNA1 & sgRNA2 site cut
1	84	100+50+50	84	28	5 ^{註1}	2	3	0
2	41	100+100+100	41	11	4 ^{註1}		2	1
	38	100+50+50	38	3	3 ^{註1}		2	1
3	78	100+100+100	60 ^{註2}	4	0			
	86	100+50+50	90 ^{註1}	22	5 ^{註1}		4	1
4	76	100+50+50	NA ^{註3}					

註1：所得基因改造鼠不符申請人預期，未出貨。

註2：注射材料濃度較高組別(100+100+100)胚移植時，因移植玻璃管斷裂故損失14個胚，另有4個胚移植至較低濃度組(100+50+50)。

註3：胚培養後分析，另於下表列出結果

由此結果推斷剔除 *rDuxbl* 基因可能造成 embryonic lethal,因此進一步將注射 sgRNA 與 Cas9RNA 之 zygote 進行培養

2. *rDuxbl* 基因剔除胚培養後基因分析結果：

Stage	Embryos	DNA deletion	efficiency
Morula/Blastocyst	2	1	50%
2-cell	9	4	44%
1-cell	1	0	0%
死胚	24	7	29%

分析存活胚的基因型發現並沒有基因剔除的胚，但 Cas9 確實造成基因的截切，但兩個切點都不在同一條 allele 上，因此推論 *rDuxbl* 基因對於早期胚的發育是必須的，因此將以條件式基因剔除大鼠來分析 *rDuxbl* 在發育與疾病上的功能。

3.將委託國家動物中心產製 *rDuxbl-loxp* 大鼠，再與 Ubiquitin C-CreER^{T2} 基因轉殖大鼠繁殖出條件式基因剔除鼠，Ubiquitin C-CreER^{T2} 基因轉殖大鼠是國家動物中心所產製，也經過初步的分析，證明 Tamoxifen 誘導產生的 Cre 可以有效的與 loxP 作用，將各組織之目標基因剔除，我們計畫以 Tamoxifen 注射肌肉誘導肌肉細胞剔除 *rDuxbl* 基因，同時注射 Cardiotoxin 使肌肉受傷後，分析缺乏 *rDuxbl* 基因是否影響肌肉的修復與再生。同時也可以在飼料中添加 Tamoxifen，兩週後觀察分析成鼠其肌肉眼睛及 brain 是否受影響，可以觀察外觀行為及組織切片染色的方式分析 *rDuxbl* 剔除對於個別組織的影響，另外也可以分析基因剔除鼠其繁殖能力是否受影響。

參考文獻:

- Anseau E, Laoudj-Chenivesse D, Marcowycz A, Tassin A, Vanderplanck C, Sauvage S, Barro M, Mahieu I, Leroy A, Mainfroid V (2009) DUX4c is up-regulated in FSHD. It induces the MYF5 protein and human myoblast proliferation. *Plos one* 4:e7482
- Boncinelli E (1997) Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev* 7:331-337
- Bosnakovski D, Lamb S, Simsek T, Xu Z, Belayew A, Perlingeiro R, Kyba M (2008a) DUX4c, an FSHD candidate gene, interferes with myogenic regulators and abolishes myoblast differentiation. *Exp Neurol* 214:87-96
- Bosnakovski D, Xu Z, Gang EJ, Galindo CL, Liu M, Simsek T, Garner HR, Agha-Mohammadi S, Tassin A, Coppee F, Belayew A, Perlingeiro RR, Kyba M (2008b) An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. *EMBO J* 27:2766-2779
- Burglin TR, Affolter M: Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*. 2015.
- Gehring WJ (1987) Homeo boxes in the study of development. *Science* 236:1245-1252
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wuthrich K (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78:211-223
- 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
- Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, et al.: Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development. *J Immunol*. 2007;179(8):5335-5345.
- Leidenroth A, Hewitt JE (2010) A family history of DUX4: phylogenetic analysis of DUXA, B, C and Duxbl reveals the ancestral DUX gene. *BMC Evol Biol* 10:364
- Li H, Tsai MS, Chen CY, Lian WC, Chiu YT, Chen GD, Wang SH (2006) A novel maternally transcribed homeobox gene, Eso-1, is preferentially expressed in oocytes and regulated by cytoplasmic polyadenylation. *Mol Reprod Dev* 73:825-833
- McBurney MW (1993) P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol* 37:135-140
- McBurney MW, Reuhl KR, Ally AI, Nasipuri S, Bell JC, Craig J (1988) Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J Neurosci* 8:1063-1073
- McBurney MW, Rogers BJ (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* 89:503-508
- Monzo HJ, Park TI, Montgomery JM, Faull RL, Dragunow M, Curtis MA: A method for generating high-yield enriched neuronal cultures from P19 embryonal carcinoma cells. *J Neurosci Methods*. 2012;204(1):87-103.
- Olguin HC, Yang Z, Tapscott SJ, Olwin BB (2007) Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol* 177:769-779
- Ryan T, Liu J, Chu A, Wang L, Blais A, Skerjanc IS (2012) Retinoic acid enhances skeletal myogenesis in human embryonic stem cells by expanding the premyogenic progenitor population. *Stem Cell Rev* 8:482-493
- Skerjanc IS (1999) Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends Cardiovasc Med* 9:139-143
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507:62-67
- van der Oost J (2013) Molecular biology. New tool for genome surgery. *Science* 339:768-770
- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343:80-84
- Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, Gruter AM, Hofker MH, Moerer P, Williamson R (1992) Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature genetics* 2:26-30
- Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM (2003) Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet* 12:2895-2907
- Wu SL, Li GZ, Chou CY, Tsai MS, Chen YP, Li CJ, Liou GG, Chang WW, Chen SL, Wang SH (2014) Double homeobox gene, Duxbl, promotes myoblast proliferation and abolishes myoblast differentiation by blocking MyoD transactivation. *Cell Tissue Res* 358:551-566

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

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/31

科技部補助計畫	計畫名稱: 闡明雙同源箱基因Duxbl對於哺乳類動物肌肉再生及胚胎發育的角色
	計畫主持人: 王淑紅
	計畫編號: 104-2320-B-040-015- 學門領域: 醫學生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：王淑紅			計畫編號：104-2320-B-040-015-			
計畫名稱：闡明雙同源箱基因Duxbl對於哺乳類動物肌肉再生及胚胎發育的角色						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇	<p>1. Guan-Ting You, Yu-An Lai, Yuan-Rong Li, Hsiao-Chi Hsu and Sue-Hong Wang (2016, Mar). Deciphering the Functions of Mouse Double Homeobox Gene, Duxbl, in Myogenesis and Neurogenesis by in vitro Differentiations of Embryonic Carcinoma Cells. The 31th Joint Annual Conference of Biomedical Sciences, 國防醫學院. 本人為通訊作者.</p> <p>2. Pei-Chi Hsieh¹, Ming-Shiun Tsai², Sue-Hong Wang (2016, Mar). Protective Effect and Mechanism of Galangin against Cisplatin-induced Acute Kidney Injury a in Mice. The 31th Joint Annual Conference of Biomedical Sciences, 國防醫學院. 本人為通訊作者.</p> <p>3. Ying-Han Wang, Ming-Shiun Tsai, and Sue-Hong Wang (2016, Mar). Protective Effect and Mechanisms of Kaempferol against Propacetamol-induced Acetaminophen-overdose in Mice. . The 31th Joint Annual Conference of Biomedical Sciences, 國防醫學院. 本人為通訊作者.</p>	
		研討會論文	3			
		專書	0			本
		專書論文	0			章
		技術報告	0			篇
	其他	0	篇			
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	

		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
國外	學術性論文	期刊論文		2	篇	1. Hsiang-Yun Tung, Sue-Hong Wang, Yu-Cheng Chiang, and Ming-Shiun Tsai (2016, Sep). Rapid Screening of Roundup Ready Soybean in Food Samples by a Hand-held PCR Device. Food Science and Biotechnology, 25(4), 1-7. (SCI: 96/124; Food Science and Technology) 2. Ming-Shiun Tsai, Chia-Chih Chien, Ting-Hui Lin, Chia-Chi Liu, Rosa Huang Liu, Hong-Lin Su, Yung-Tsung Chiu, Sue-Hong Wang* (2015, Nov). Galangin Prevents Acute Hepato-Renal Toxicity in Novel Propacetamol-Induced Acetaminophen-Overdose Mice. Journal of Medicinal Food, 18(11), 1187-1195. (SCI, 51/123; Food Science and Technology). NSC 99-2314-B-212-001-MY3. 本人為通訊作者。	
		研討會論文		0			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
		智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
					已獲得	0	
	新型/設計專利			0			
	商標權			0			
營業秘密			0				
積體電路電路布局權			0				

		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	3	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）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：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

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200字為限）

相關研究成果已發表於生物醫學年會之研討會壁報論文

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，以500字為限）

1. 學術成就上：

研究成果的發表將使我國在雙同源箱基因在哺乳動物個體發育上的生理功能的研究上具有領先地位。

2. 技術創新：

以目前最新研發的CRISPR-Cas9系統產製基因剔除大鼠，進行rDuxbl新穎基因功能分析，若成功完成及發表，將可以在國際上展現國人的研究實力。

3. 學術價值：

本研究成果發現Duxbl基因異常表現除了影響出生後肌肉的再生修補之外，也影響胚胎期肌肉的發育，及神經細胞的發育，另外無法成功產製基因剔除大鼠及獲得基因剔除的早期胚，推測Duxbl基因除了與肌肉發育有關之外，更可能與個體發育存活有關。

4. 應用價值：Duxbl可能致病分子機制上的研究結果，將協助我們對於人類雙同源箱基因致病機轉的了解；進一步找出治療法有利病人的治療，另外Duxbl對於胚幹細胞體外分化為不同細胞的影響，有助於胚幹細胞體外分化為神經細胞，以做為細胞治療之參考；

5. 在社會高科技人才的訓練方面：參與研究的工作人員可以學習到基礎分子操作技術及病理解剖分析及胚幹細胞的操作，因此將來不管是從事基礎醫學研究的工作或產業界的生物科技的工作，都是具有競爭力的高科技人才。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：■否 □是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：■否 □是

說明：(以150字為限)