

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## DBY 基因的啟動子及睪丸組織的轉錄調控分析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-041-002-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學嬰幼兒保育系

計畫主持人：鄧燕妮

共同主持人：林永明

計畫參與人員：鄭東佳、許沛陽

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 27 日

# DBY 基因的啟動子及睪丸組織的轉錄調控分析

The promoter assays and transcription regulation in testis for DBY gene.

計畫編號：NSC 94-2320-B-041-002-

執行期限：94年7月1日至95年8月31日

主持人：鄧燕妮 嘉南藥理科技大學嬰幼兒保育系

## 中文摘要

DBY 基因在睪丸組織表現特定長度 2319 bps 的轉錄產物，在其他器官則表現較長的轉錄產物 (4416 bps)，推測 DBY 在睪丸組織有特定轉錄機制進行調控，因此本研究針對 DBY 基因進行啟動子位置的分析，將 DBY 基因 coding region 上游可能為轉錄啟動子區域，以 PCR 增幅放大後，構築到 pGL3-basic 載體中，與 pGL3-SV40 載體共轉染到 293T 細胞 (human embryonic kidney cell)、TM3 (mouse leydig cell)、TM4 (mouse sertoli cell) 和 GC-2spd(ts) (mouse spermatocyte cell) 等四種細胞株中，以螢光蟲發出 luciferase 的冷光強度分析此些區域轉錄表現情形，以確定 DBY 基因啟動子的正確位置及其對轉錄調控情形及在 293T 細胞 (human embryonic kidney cell)、TM3 (mouse leydig cell)、TM4 (mouse sertoli cell) 和 GC-2spd(ts) 等四種細胞株的冷光活性表現，瞭解 DBY 基因啟動子在不同組織細胞中表現及調控的差異。

研究結果顯示，在 293T 細胞 (human embryonic kidney cell)、TM3 (mouse leydig cell)、TM4 (mouse sertoli cell) 等細胞株中，DBY 基因轉錄起始點上游-316 至轉錄起始點 (start codon, +1) 區域為啟動子最強的區域；但在 GC2-spd (mouse spermatocyte cell) 細胞株中，DBY 基因轉錄起始點上游-515 至轉錄起始點 (start codon) 下游+634 區域有較強啟動子活性，轉錄起始點上游-316 至轉錄起始點 (start codon, +1) 區域的啟動子活性則與其他區域沒有明顯差異。由以上研究結果推測，生殖 spermatocyte 細胞 (如：mouse GC2-spd spermatocyte cell) 的轉錄調控方式與一般體細胞 (somatic cell) 有所不同。針對 DBY 基因啟動子可能區域 (-316~+1) 進行轉錄因子分析，在-200~-100 及-30 區域分別有 GC box、CAT box 及

TATA box，取有 SP1、AP-1 及 CBP 等轉錄因子結合位置，此區域 (-316~+1) 在體細胞是轉錄作用重要區域。而在生殖細胞轉錄起始點 (start codon) +1 至下游+634 區域應有可促進轉錄活性的因子調控，以加強轉錄作用的進行。

**關鍵字：**DBY 基因，啟動子，冷光

## Abstract

This study is focused on promoter analysis of DBY gene. In the promoter assay, the sequences of upstream of coding region for DBY will be available from genebank by bioinformatics search. The specific primers and PCR conditions for the upstream of start site for DBY gene will be designed and PCR product will be constructed into pGL3-basic vector. The constructor pGL3-basic vectors and pGL3-SV40 vector will be co-transfected to 293T (human embryonic kidney cell)、TM3 (mouse leydig cell)、TM4 (mouse sertoli cell) and GC2-spd (mouse spermatocyte cell) cells. The promoter region of DBY gene will be determined by assaying the firefly luciferase activity.

The prediction promoter region of human DBY gene in -316 to +1, containing GC box、CAT box and TATA box at -200、-100 and -30 regions, that containing putative transcription factor binding site of SP1、AP-1 and CBP. Luciferase reporter analysis of a 3.0 kb 5'-flanking sequence (-2235 to +634 with respect to the transcription start site). Serial deletions analysis promoter activity in 293T (Human embryonic kidney cell lines), TM3 (mouse Leydig cell), TM4 (mouse Sertoli cell) and GC-2spd(ts) (mouse spermatocyte) that revealed -316 to +1 fragment is core promoter region. The +1 to +634 fragment has strong promoter activity in GC2-spd (mouse spermatocyte cell) but not in 293T (human

embryonic kidney cell)、TM3 (mouse leydig cell)、TM4 (mouse sertoli cell), suggesting the region has presence of positive regulator element. The transcription regulation and gene expression of germ cells are different from somatic cells.

**Key words:** DBY, promoter, luciferase

## 緒論

### 男性不孕症與 Y 染色體顯微缺失的關係

男性不孕症的原因可分為遺傳性與非遺傳性因素 (Larry and Lipshutz, 1997)。非遺傳性因素包括環境因素、生活習慣、生理因素等。在遺傳因素方面, 目前已知會影響男性生殖能力的遺傳因素大部分與染色體數目、結構異常或單基因遺傳疾病的問題有關 (Mak and Javi, 1996)。但在不孕症的男性中, 約有 40-60% 在臨床理學檢查中無法確定其不孕症原因, 因此將這些病人歸類為不明原因的不孕症 (idiopathic azoospermia) (De Kretser and Burger, 1997; Tuerlings *et al.*, 1997)。

根據細胞遺傳學的研究發現, 部分無精蟲症 (azoospermia) 患者的 Y 染色體長臂 (Yq) 末梢 (distal) 上的第六區間有缺失的現象, 推測 Yq distal 位置必定存在與造精功能 (spermatogenesis) 相關的基因, 將之稱為 azoospermia factor (AZF) (Tiepolo and Zuffardi, 1976)。近年來利用位於 Y 染色體第五及第六區間上的 STSs 以聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方法, 進行 Y 染色體顯微結構分析, 發現部分無精蟲症患者有 Y 染色體的顯微缺失 (Henegariu *et al.*, 1994; Kirsch *et al.*, 1996; Stuppia *et al.*, 1996a,b; De Kretser and Burger, 1997; Girardi *et al.*, 1997; Stuppia *et al.*, 1997; Stuppia *et al.*, 1998; Kenet-First *et al.*, 1999)。Vogt 等人將 Y 染色體 AZF 區域分成 AZFa、AZFb、AZFc 三個區域 (Vogt *et al.*, 1996)。約有 10-15% 的 azoospermia 及 5-10% severely oligozoospermia 患者有 Y 染色體顯微缺失的現象 (Reijo *et al.*, 1996)。一般認為 AZFa 區域的缺失與 Sertoli cell-only syndrome (SCOS) 有關; AZFb 區域的缺失

與精蟲成熟障礙 (maturation arrest) 有關, 將使造精功能停留在 pachytene spermatocyt 時期; AZFc 區域缺失將使造精功能停止在 spermatid 時期, 無法有成熟的精子產生 (McElreavey and Krausz, 1999)。其中位於 AZFa 區域的 DBY 及 DFFRY、AZFb 的 RBMY 及 AZFc 的 DAZ 等基因缺失被認為可能造成精子發育障礙 (Graeme *et al.*, 1998; Carlo *et al.*, 2000)。DBY 基因序列分析具有 RNA helicase 特定的區域, 推測可能與 RNA 結構、穩定度及表現有關, 進而影響造精過程中其他基因的表現 (Lerry *et al.*, 1989; Sherry *et al.*, 1994)。

### Y 染色體基因的啟動子分析與調控

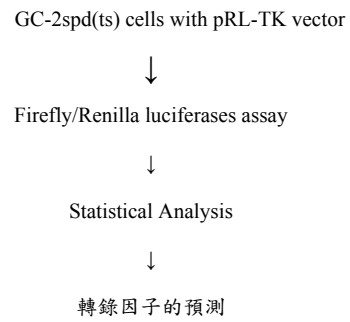
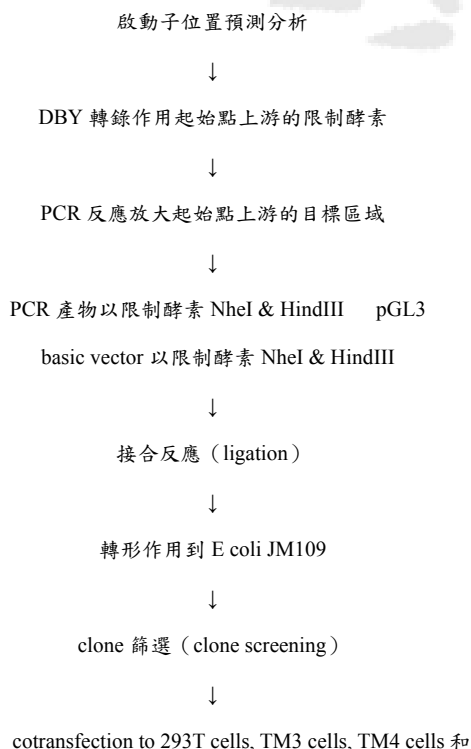
Y 染色體上的許多基因有其特殊的表現方式, 例如 DFFRY 基因具有兩種轉錄產物, 此二種轉錄產物的主要差別是其 3'UTR 區域長短不一, 在睪丸組織僅表現較短的產物, 較長產物則表現在其他組織。許多 X 染色體及 Y 染色體相似度極高的基因, 均具有睪丸組織特殊表現的轉錄產物, 且其轉錄啟動子及轉錄因子與其他基因有極大差別, 以 DFFRY 基因為例, DFFRY 基因具有 CCAAT box 的 TATA less 的轉錄啟動子, 其在睪丸組織結合的轉錄因子包括 Spl, CEBPB, ELK1, Gata, Sry/Sax5 等 (Hall *et al.*, 2003), 推測 DFFRY 基因利用轉錄啟動子的特殊序列及睪丸組織特殊轉錄因子的結合, 以達到在睪丸組織中特殊表現的目的。

### DBY 基因結構與表現

DBY 基因位於 Y 染色體 AZFa 區域, 約在 deletion interval 5C/D 的位置 (Lahn and Page, 1997), DBY (DEAD/H box polypeptide, Y chromosome) 基因全長為 15500 鹼基對包含 17 表現子, 經選擇性 polyadenylation 產生 DBY1 和 DBY2 兩種 mRNA (表一)。DBY1 mRNA 全長 2319 鹼基只表現在睪丸組織; DBY2 mRNA 較 DBY1 多了 3'端非轉錄區域 (untranslated region), 全長為 4416 鹼基, 為廣泛的表現在各組織中。DBY1 及 DBY2 mRNA 均表現含 660 胺基酸的蛋白質 (Carlo *et al.*, 2000)。DBY 蛋白質結構由 N 端到 C 端依序排列包含 ATP binding domain、ATP hydrolysis/RNA unwinding domain 及 ATP hydrolysis/RNA binding

domain。於 ATP hydrolysis/RNA unwinding domain 含有 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) motif。DEAD motif 廣泛存在於各種物種基因中，且序列呈現高度相似性，如酵母菌的 DED1 與 DBP1；果蠅的 vasa；老鼠的 mDEAD2、mDEAD3、PL10 及轉譯起始因子 (translation initiation factor - 4A)，被推測為具有 RNA helicase 功能 (Lerry *et al.*, 1989；Sherry *et al.*, 1994)。Carlo 等人分析 Y 染色體缺失發現，於 AZFa 區域 DBY 基因缺失，造成嚴重生殖細胞減少或完全缺乏 (Carlo *et al.*, 2000；Foresta *et al.*, 2000)。過去對於 DBY 蛋白質在生殖細胞 (germ cell) 表現研究發現，轉譯作用 (translation) 是重要調控因素，然對於轉譯作用 (transcription) 在造精過程中調控則尚未被清楚研究 (Ditton *et al.*, 2004)。本研究擬將 DBY 基因轉錄起始點 (transcription start site) 上游可能為啟動子的區域，構築到 pGL3-basic 載體中，以 dual luciferase 分析 DBY 基因啟動子表現情形，確定 DBY 基因啟動子的正確位置，進而瞭解 DBY 基因調控表現情形及在男性造精功能中所扮演的角色。

#### ◆本研究流程圖：



#### 實驗材料

##### ◆分析軟體

- \* Promoter 2.0 Prediction Server : <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>
- \* WWW Promoter Scan : <http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan/>
- \* Restriction Enzyme Map Analysis : [http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/enzyme\\_cuttingtool](http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/enzyme_cuttingtool)
- \* TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>

##### ◆載體

- \* pGL3-basic vector (Promega)
- \* pGL3-promoter vector (Promega)
- \* pRL-TK Vector (Promega)

##### ◆細胞株

- \* 293T Cell
- \* TM3 mouse Leydig cell line (ATCC<sup>®</sup> Number: CRL-1714<sup>™</sup>)
- \* TM4 mouse Sertoli cell line (ATCC<sup>®</sup> Number: CRL-1715<sup>™</sup>)
- \* GC-2spd(ts) cell line (Mouse spermatocyte, ATCC<sup>®</sup> Number: CRL-2196<sup>™</sup>)

##### ◆試劑

- \* Lipofectamine 2000 (Invitrogene)
- \* Opti-MEM (Invitrogene)
- \* Dual-Glo<sup>™</sup> Luciferase Assay System (Promega, Catalog number : E2920)

##### ◆儀器

- \* 熱循環機器 (PX2 Thermo electron, made in U.S.A)
- \* 冷光分析儀 (Luminoskan Ascent, Thermo Labsystems 岑祥公司代理)

#### 實驗方法

以啟動子分析軟體 (Promoter 2.0 Prediction Server) :

<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/> ;

WWW Promoter Scan :

<http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan/> 預測啟動子可能的位置, 由轉錄作用起始點 5' 端上游區域以 PCR 反應放大, 將不同片段的序列接在 luciferase 報導基因 (reporter gene) 之前, 藉由分析 luciferase 活性高低, 預測啟動子的強弱及位置, 由於 luciferase 報導基因 (reporter gene) 為酵素型態, 因此當啟動子愈強時, 所製作出來的酵素就愈多。藉由此方式來分析啟動子正確位置, 並利用在不同細胞株 (293T cells, TM3 cells, TM4 cells 和 GC-2spd(ts) cells) 的分析比較, 瞭解不同細胞間的轉錄調控的差異。

### 搜尋人類 DBY 基因體 DNA 及預測啟動子區域 (promoter region)

人類 DBY 完整的 cDNA 序列於 NCBI web 資料庫中進行比對, 獲得 BAC clone, 即可得到 DBY 基因體序列。將 DBY 基因體序列的包含轉譯起始前的一段序列, 約 3.0 kb 的片段, 藉由 Promoter 2.0 Prediction Server 及 WWW Promoter Scan 進行軟體預測人類 DBY 啟動子區域。

### 細胞培養 (cell culture)

293T 細胞為人類腎臟細胞株 (Human embryonic kidney cell lines), 使用 DMEM/F12 培養液 (GIBCO, Catalog number 11330) 外加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 培養於 37°C 5% CO<sub>2</sub>, 一星期更換細胞生長培養基 (growth medium) 2~3 次。

TM3 細胞 (mouse Leydig cell lines) 及 TM4 細胞 (mouse Sertoli cells), 使用 DMEM/F12 培養液, 外加 5% 馬血清 (horse serum); 2.5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 培養於 37°C 5% CO<sub>2</sub>, 一星期更換細胞生長培養基 (growth medium) 2~3 次。

GC-2spd(ts) cells 為老鼠的生殖細胞株 (mouse spermatocyte), 使用 DMEM 培養液, 外加 0.1mM non-essential amino acid、1.0 mM sodium pyruvate 及 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 培養於 37°C 5

% CO<sub>2</sub>, 一星期更換細胞生長培養基 (growth medium) 2~3 次。

### 人類 DBY 轉錄調控位置分析

參考軟體預測的啟動子區域 (promoter region), 我們設計不同的分析片段將其接在 luciferase 報導基因 (reporter gene) 之前 (圖一), 並於不同的細胞株中觀察啟動子活性的表現情形。

首先, 將轉譯起始點附近約 3.0 kb (-2235 至 +634) 的片段先分析其具有的限制酵素切點 (Restriction Enzyme Map Analysis), 再針對 pGL3-basic vector 載體的 multiple cloning sites (MCS) 所具有的限制酵素切點, 挑選不會切到分析片段序列的限制酵素序列接在引子上 (as linker)。轉錄起始點附近約 1.3 kb 的片段由其 5' 端進行序列刪除, 於正向引子 (forward primer) 接上 *NheI* 限制酵素辨識位置 (CTA-G<sup>↓</sup>CTAGC) 和反向引子 (reverse primer) 接上 *HindIII* 限制酵素辨識位置 (A<sup>↓</sup>AGCTT-GGG), 經 PCR 反應所得的產物與 pGL3-basic vector 正向相接。相反的, 於正向引子 (forward primer) 接上 *HindIII* 限制酵素辨識位置 (A<sup>↓</sup>AGCTT-GGG) 和反向引子 (reverse primer) 接上 *NheI* 限制酵素辨識位置 (CTA-G<sup>↓</sup>CTAGC), 經 PCR 反應所得的產物與 pGL3-basic vector 反向相接, 作為一負對照, 證實正向相接的序列才具有啟動子活性, 可使報導基因 (Luciferase gene, *luc*<sup>+</sup>) 表現。

PCR 反應條件: 取 1 μl 基因體 DNA (100ng/μl), 加入 2 μl 10X PCR buffer、0.4 μl dNTP (10 mM)、0.8 mM~1.5mM MgCl<sub>2</sub>、1 μl forward primer (10 μM)、1 μl reverse primer (10 μM)、0.1 μl *Taq* DNA polymerase (5U/μl), 加水將體積調整為 20 μl, 經由熱循環機器進行 PCR 放大反應。PCR 反應條件為: 95°C 作用 5 分鐘, 使雙股 DNA 變性, 再以循環式的裂解溫度 95°C 1 分鐘、煉合溫度 59~68°C 1 分鐘、延長溫度 72°C 1 分鐘進行 45 個循環, 最後以 72°C 處理 10 分鐘。反應結束後, 以 1% 瓊脂膠體進行電泳分析, 並將 PCR 產物送定序確認是否為我們要的片段, 分別獲得 -316/+1, -407/+1, -515/+1, -62/+634, -515/+634, -1561/-609, -2235/+1596, 片段其設計為正向

與 pGL3-basic vector 相接；另外設計反向的 -515+1 片段與 pGL3-basic vector 相接，當作負對照。

### pGL3 與啟動子片段的轉殖載體構築

不同分析片段的 PCR 產物經由 PCR-M<sup>R</sup> Clean Up System 將產物純化；並進行限制酵素處理：50  $\mu$ l 純化產物、2  $\mu$ l *Nhe*I (10U/ $\mu$ l, New England Biolabs)、1  $\mu$ l *Hind*III (20U/ $\mu$ l, New England Biolabs)、10  $\mu$ l NEBuffer 2 (10X)、1  $\mu$ l BSA (100X)、加水將體積補到 100  $\mu$ l，於 37°C 下作用 2 小時，再追加 2  $\mu$ l *Nhe*I、1  $\mu$ l *Hind*III 於 37°C 下作用 16~18 小時。隔天，將限制酵素作用後的產物以 1% 瓊脂膠體進行電泳分析，使用 Gel-M<sup>TM</sup> Gel Extraction System 進行純化。

pGL3-basic vector 為不具啟動子活性的載體，將欲分析的啟動子片段接於報告基因 (Luciferase gene, *luc*<sup>+</sup>) 之前，藉由酵素活性表現情形可得知啟動子活性的強弱 (圖一)。pGL3-basic vector 也需以 *Nhe*I (10U/ $\mu$ l) 及 *Hind*III (20U/ $\mu$ l) 限制酵素進行處理，步驟同 PCR 產物處理；處理過的載體須先進行轉型作用 (transformation) 到 JM109 勝任細胞，確認限制酵素處理過的缺口不會自行接合，才可進行載體構築步驟。

經 *Nhe*I 及 *Hind*III 處理過的不同分析片段 PCR 產物及 pGL3-basic vector 進行接合反應，置於 4°C 16~18 小時。隔天，進行轉型作用，於 37°C 培養 16~18 小時；進行重組質體的製備與篩選，將含有正確插入子 (insert) 的質體 DNA 送定序再次確認其產物。

### 真核細胞之轉染作用 (co-transfection experiments in Eukaryote cell)

進行轉型作用 (transfection) 的前一天，將培養中的細胞 (293T cells, TM3 cells, TM4 cells 和 GC-2spd(ts) cells) 使用 1X trypsin-EDTA solution/1X PBS 將細胞打散並計數，使用 96well 分盤使每個 well 中的細胞數為 10000 cell / 100  $\mu$ l，於 37°C 培養 16~18 小時；於轉型作用進行中需注意不可使用含抗生素 (antibiotics) 的培養基。

隔天，當細胞長到 90-95% 時，即可使用 Lipofectamine 2000 試劑進行轉型作用

(co-transfection)。步驟：配製所需的 DNA-Lipofectamine 2000 complex：(1)、將已構築好的 pGL3-basic vector (會表現 firefly luciferase 活性) 與 pRL-TK vector (會表現 renilla luciferase 活性) 以 renilla (20 ng)：firefly (200 ng) 為 1：10 混合於 Opti-MEM (Invitrogene)，調整體積為 25  $\mu$ l。(2)、Lipofectamine 2000 於使用前配製，取 0.5  $\mu$ l Lipofectamine 2000 加到 24.5  $\mu$ l Opti-MEM，將 25  $\mu$ l 的體積混合均勻，於室溫下培育 5 分鐘，再加入到已配製好的 plasmid DNA 中混合均勻，此時總體積為 50  $\mu$ l，於室溫下培育 20 分鐘使形成複合體。於每個分析 well 中 (內含有細胞及生長培養基) 加入 50  $\mu$ l DNA-Lipofectamine 2000 複合體，來回搖晃 96 well 培養盤使內容物混合均勻。於 37°C 培養，直到分析前才取出。

### 啟動子冷光活性及啟動子位置的預測分析

使用 Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay System，可同時測得 firefly 和 renilla luciferases 的活性，並同時轉染具有 SV40 promoter 的 pGL3-promoter vector，當作 positive control。藉由酵素活性 (luciferases) 表現可反應啟動子活性的強弱。實驗中所用到的 pRL-TK vector 會表現 renilla luciferases 的活性，其目的為將含有不同分析片段的 pGL3-basic vector 之 firefly luciferases 的活性標準化 (normalize)，故其 pRL-TK vector 當作一內部控制組 (internal control) (圖一)，本實驗至少重覆進行三次的活性分析。

實驗分析步驟為：取出已被 transfection 的細胞，去除 100  $\mu$ l 培養基。於成大醫院 9B 實驗室，使用王憲威老師負責管理的冷光分析儀進行分析，分析時所有的試劑需回到室溫才可使用，此時酵素才具有催化活性。加入 50  $\mu$ l Dual-Glo luciferase reagent 與含有 50  $\mu$ l transfection 的細胞液混合均勻後，取出置於分析用的白盤中 (NUNC DENMARK，購買自岑祥公司)，至少靜置 10 分鐘，冷光分析儀首先偵測 firefly luciferase activity；再加入新鮮配置的 50  $\mu$ l Dual-Glo Stop and Glo reagent (Dual-Glo Stop and Glo substrate：Dual-Glo Stop and

Glo buffer 以 1:100 配置所需的量) 終止 firefly luciferase activity, 待混合均勻後至少靜置 10 分鐘, 測 renilla luciferase activity。

### 統計分析

將分析結果所測得的 firefly 和 renilla luciferases 活性相除 (firefly/renilla luciferases), 求得其相對活性表現值 (Relative Luciferase Activity)。使用 GraphPad Prism Version 2.0 Software 進行統計分析, 以 One Way ANOVA 統計方式及繪圖, 檢定不同的啟動子分析片段於不同細胞株中的 luciferases 相對活性表現情形。

### 轉錄因子之預測

人類 DBY 啟動子區域預測結果其位於 -198 至 +53 間 (-316/+1), 藉由分析軟體 TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites, 預測此區域間可能參與轉錄調節作用的轉錄因子為何。

## 結果

### 人類 DBY 基因體 DNA 之特性

為了解人類 DBY 基因的轉錄調節機制, 我們將人類 DBY 基因含轉錄起始點前的一段序列約 3.0 kb 的片段, 藉由 Promoter 2.0 Prediction Server 及 WWW Promoter Scan 軟體預測人類 DBY 的啟動子區域位在 -316 至 +1 之間, 一段約 316 bp 的片段。其中含有常見的一般序列 GC-rich、(consensus sequence) TATA box (TATA-less promoter) 和 CCAAT box, 於轉譯起始點 (+1) 上游預測其具有分別有 GC box、CAT box 及 TATA box, 取有 SP1、AP-1 及 CBP 等轉路因子結合位置, 此區域 (-316~+1) 對轉錄作用是重要區域 (圖二)。

(三)、人類 BC009436 啟動子活性 (promoter activity) 之分析

轉錄起始點附近約 1.3 kb (-1270/+53) 的片段, 藉由不同引子的設計, 以 PCR 方式獲得不同的分析片段, 分別為 -316/+1, -407/+1, -515/+1, -62/+634, -515/+634, -1561/-609, -2235/+1596 等片段, 於正向及反向引子分別接上 *HindIII* 及 *NheI* 限制酵素的辨識位, 此些 PCR 產物與 pGL3-basic

vector 正向相接; 另外設計 -515/+1 片段分別與 pGL3-basic vector 反向相接。構築完成的載體以 *NheI* 及 *HindIII* 等限制酵素確認此些 DNA 片段在 pGL3-basic 載體中構築情形。

構築完成的 pGL3 basic 載體與 pRL-TK 載體於不同的細胞株 (293T cells, TM3 cells, TM4 cells 和 GC-2spd(ts) cells) 中一起進行轉型作用 (co-transfection), 分析此些 DNA 片段的啟動子活性在不同種類細胞表現情形; pRL-TK vector 會表現 renilla luciferases 的活性其目的為將含有不同分析片段的 pGL3-basic vector 之 firefly luciferases 的活性標準化 (normalize); pRL-TK vector 當作內部控制組 (internal control), 此實驗重複進行三次。不同細胞株 (293T cells, TM3 cells, TM4 cells 和 GC-2spd(ts) cells) 中觀察不同片段的啟動子相對活性分析結果顯示: (一)、於上述四種不同細胞株中啟動子的活性表現情形, 顯示 -316 至 +1 的片段與其它的分析片段相比有最高的 luciferase activity 表現, 將此區域定義為 core promoter region; 其結果與先前所預測的啟動子區域相符合。

(二)、當此 core promoter region (-316 至 +1) 繼續往下游分析到 +634 (此為轉譯起始點位置) 時, 其分析結果顯示於 293T 細胞, TM3 細胞與 TM4 細胞中可見 -634 至 +1 片段活性表現明顯增加, 推測在 -634 至 +1 間可能有 positive regulator element 存在 (圖一)。

(三)、-316~+634 的啟動子活性有明顯增加的趨勢, 尤其在 GC-2spd(ts) cell 特別明顯, 推測 DBY 在在體細胞 (293T cells, TM3 cells, TM4 cells) 與 germ cell (GC-2spd(ts) cell) 有不同的調控方式。

## 討論

人類 DBY 轉錄調節作用活性分析中 (Deletion analysis), 使用不同的細胞株 (293T cells, TM3 cells, TM4 cells 和 GC-2spd(ts) cells) 觀察不同的分析片段中啟動子活性 (promoter activity) 表現情形:

(一)、在不同細胞株 (293T cells, TM3 cells, TM4 cells 和 GC-2spd(ts) cells) 中啟動子活性表現情形, 皆顯示 -316 至 +1 的片段與其它的分析片段相比時有最高的 luciferase activity 表現, 此區域定義為 core promoter

region；其結果與先前所預測的啟動子區域相符合。(二)、當此 core promoter region (-316 至+1)繼續往下游分析到+100(此為轉譯起始點位置)時，分析結果顯示 293T 細胞, TM3 細胞與 TM4 細胞中可見-316 至 +634 片段活性表現明顯增加，推測在+1 至 +634 間可能有 positive regulator element 存在。綜合啟動子活性分析實驗結果得知人類 BC009436 的轉錄調節作用受到許多轉錄因子調節；於不同細胞株中(293T cells, TM3 cells, TM4 cells 和 GC-2spd(ts) cells) 所得到不同分析片段啟動子活性的表現情形，推測人類 DBY 基因的表現可能受到正向調節因子及負向調節因子共同調控著。啟動子活性分析結果顯示人類 DBY 基因在 germ cells (GC-2spd(ts)) 與 somatic cells (293T、TM3、TM4) 有不同的轉錄調控方式。

#### Electronic-Database Information :

1. testisBank:  
<http://medweb.uni-muenster.de/TestisBank/>
2. NCBI (National Center for Biotechnology Information)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. UniGene:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene&cmd=search&term=>

#### 參考文獻

De Kretser, D. M., and Burger, H. G. (1997) The Y chromosome and spermatogenesis. *N Engl J Med* 336:576-577.

Ditton, H. J., Zimmer, J., Kamp, C., Rajpert-De Meyts, E., Vogt, P. H. (2004) The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Hum Mol Genet* 13:2333-2341

Foresta, C., Ferlin, A., Moro, E. (2000) Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 9:1161-1169.

Girardi, S. K., Mielnik, A., Schlegel, P. N.

(1997) Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 12:1635-1641.

*ol Genet* 1998 7:97-107.

Hall, N. M., Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Mitchell, M., Rocha, D., Affara, N. A. (2003) *Usp9y* (ubiquitin-specific protease 9 gene on the Y) is associated with a functional promoter and encodes an intact open reading frame homologous to *Usp9x* that is under selective constraint. *Mamm Genome* 14:437-447.

Henegariu, O., Hirschmann, P., Kilian, K., Kirsch, S., Lengauer, C., Maiwald, R., Mielke, K., and Vogt, P. (1994) Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia* 26:97-106.

Kenet-First, M., Muallem, A., Shulta, J., Pryor, J., Robberts, K., Nolten, W., Meisner, L., Chandley, A., Gouchy, G., Jorgensen, L., Havighurst, T., and Grosch, J. (1999) Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 53:27-41.

Kirsch, S., Keil, R., Edelmann, A., Henegariu, O., Hirschmann, P., Lepaslier, D., and Vogt, P. H. (1996) Molecular analysis of the genomic structure of the human Y chromosome in the euchromatic part of its long arm (Yq11). *Cytogenet cell Genet* 75:197-206.

Lahn, B. T., and Page, D. C. (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675-680.

Larry, I., and Lipshutz, S. S. (1997) Infertility in the male. Third edition. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 173-174.

Lerry, P., Alzari, P., Sassoon, D., Wolgemuth, D., Fellous, M. (1989) The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase. *Cell*



57: 549-59.

Mak, V., and Jarvi, K. A. (1996) The genetics of male infertility. *J Urol* 156:1245-1257.

McElreavey, K., and Krausz, C. (1999) Sex chromosome genetics '99 male infertility and the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 64:928-933.

Reijo, R., Alagappan, R. K., Patrizio, P., and Page, D. (1996) Severe oligospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347:1290-1293.

Sherry, L. G., John, G. C. (1994) Mouse erythroid cells express multiple putative RNA helicase genes exhibiting high sequence conservative from yeast to mammals. *E S* 140:171-177.

Stuppia, L., Calabrese, G., Franchi, P. G., Mingarelli, R., Gatta, V., Palka, G., and Dallapiccola, B. (1996a) Widening of a Y-chromosome interval 6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the *RBM1* and *DAZ* genes. *Am J Hum Genet* 59:1393-1395.

Stuppia, L., Mastroprimiano, G., Calabrese, G., Peila, R., Teneaglia, R., and Palka, G. (1996b) Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermia. *Cytogenet Cell Genet* 72:155-158.

Stuppia, L., Gatta, V., Mastroprimiano, G., Pompetti, F., Calabrese, G., Franchi, P. G., Morizio, E., Mingarelli, R., Nicolai, M., Tenaglia, R., Improta, L., Sforza, V., Bisceglia, S., and Palka, G. (1997) Clustering of Y chromosome deletions in subinterval E of interval 6 supports the existence of an oligozoospermia critical region outside the *DAZ* gene. *J Med Genet* 34: 881-883.

Stuppia, L., Gatta, V., Calabrese, G., Franchi, P. G., Morizo, E., Bombieri, C., Mingarelli, R., Sforza, V., Frajese, G., Tenaglia, R., and Palka, G. (1998) A quarter of men with idiopathic oligo-azoospermia display chromosomal

abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11. *Hum Genet* 102:566-570.

Tiepolo, L., and Zuffardi, O. (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34:119-124.

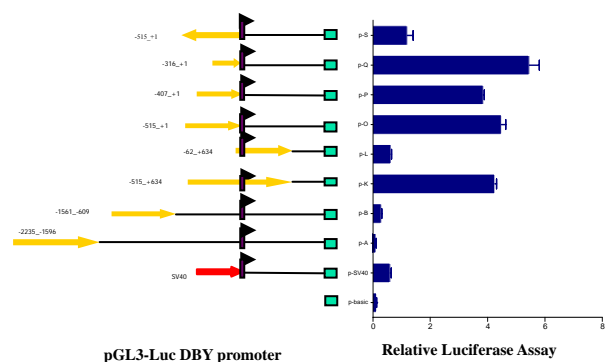
Tuerlings, J., Kremer, J., and Meuleman, E. (1997) The practical application of genetics in the male infertility clinic. *J Androl* 18:576-581.

Vogt, P. H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., and Kohn, F. M. (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5:933-943.

表一 DBY 的兩種主要轉錄產物特性及表現位置的比較

DBY	mRNA	Length (bp)	protein	expression
Homo sapiens dead box, Y isoform (DBY) mRNA: <a href="#">AF000985</a>	alternative transcript 1	2319 bp	AAC51832 : 660 aa	testis
Homo sapiens dead box, Y isoform (DBY) mRNA: <a href="#">AF000984</a>	alternative transcript 2	4416 bp	AAC51831 : 660 aa	All organs

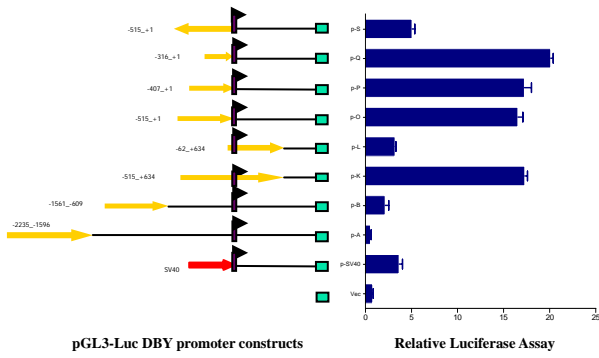
(A)



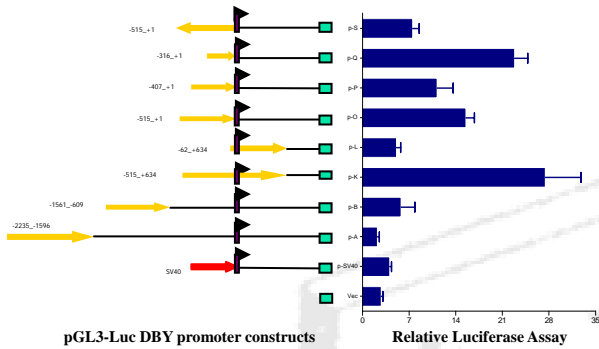
(B)

### 計畫成果自評部份

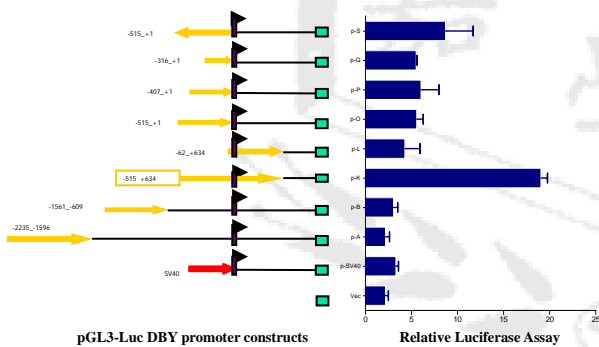
本研究已達到分析睪丸組織轉錄位置的分析，並進而推測體細胞與 germ cells 的差異，這是對於 DBY 基因轉錄作用的初步瞭解，至於如何臨床運用，則有待進一步深入的研究及發展。



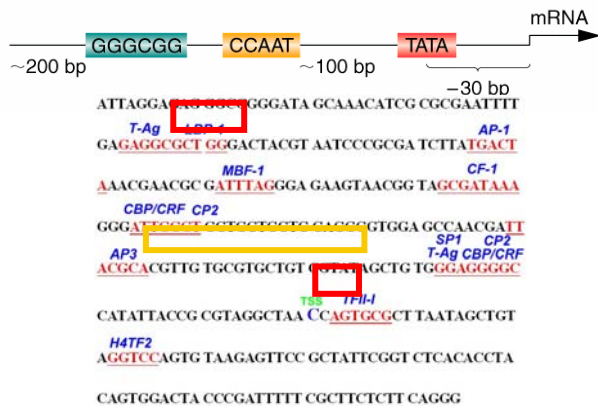
(C)



(D)



圖二、人類 DBY 基因啟動子區域的活性分析 (A) 在 293T 細胞分析 (B) 在 TM3 細胞分析 (C) 在 TM4 細胞分析 (D) 在 GC2-spd 細胞分析



圖三、人類 DBY 基因啟動子區域的特性及轉錄因子結合位置分析。