

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫名稱：探討白色念珠菌 Not4 泛素化 Jhd2 對組蛋白 H3 第四賴胺酸之甲基化及形態的影響 *
* *****

執行計畫學生：李宜樺
學生計畫編號：NSC 101-2815-C-040-028-B
研究期間：101年07月01日至102年02月28日止，計8個月
指導教授：謝家慶

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

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 102年03月29日

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

*
* 計畫 探討白色念珠菌 Not4 泛素化 Jhd2 對組蛋白 H3 *
:
名稱 第四賴胺酸之甲基化及形態的影響
*

執行計畫學生： 李宜樺

學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040 -028-B

研究期間： 101 年 7 月 1 日至 102 年 2 月底止，計 8 個月

指導教授： 謝家慶 副教授

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學 生物醫學科學學系

中華民國 102 年 3 月 29 日

Abstract

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是一種人類伺機性真菌，其多樣性的生長形態與其致病力有關，其中 *NOT4* 基因的存在與否與其生長形態及致病力改變的關係已被證實，由於 *NOT4* 編碼 E3 泛素連接酶而在釀酒酵母菌中已知其受質為能編碼組蛋白 H3 第四賴胺酸 (H3K4) 去甲基酶之 *JHD2*。

本研究將探討白色念珠菌 *Not4*(*CaNot4*) 是否透過 *Jhd2* 對 H3K4 之甲基化產生影響。首先利用 Tet-on 系統過量表現 *Not4*，觀察 H3K4 甲基化是否與 *JHD2* 同合子無功能 (homozygous null) 菌珠品系有相同影響以確認兩基因作用於同一路徑。未來也將探討 *Jhd2* 是否透過 *Not4* 泛素化後降解而被抑制，並構築 *NOT4* 同合子無功能菌株品系，同時觀察兩基因交互作用對形態生成(morphogenesis) 的影響。其下游可能透過 H3K4 甲基化使轉錄表現受影響之基因將發展染色質沉澱 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 發掘。本研究旨在發掘白色念珠菌中與組蛋白甲基化有關基因與形態生成的關係。

Introduction

白色念珠菌為人類伺機性真菌，近十年來是醫院主要的真菌感染源之一，通常感染免疫力較差的病人，導致病人出院時間增加甚至死亡。白色念珠菌能以酵母菌型、菌絲型及假菌絲型等態生長，此種形態的可塑性與

其致病力有正相關。

由於白色念珠菌和釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的同源性相當接近，而本次探討的 *NOT4* 之基因產物在釀酒酵母菌中已被證實會透過泛素化降解其下游基因 *JHD2* 之產物，進而使 Jhd2 對 H3K4 去甲基活性喪失達到 H3K4 去甲基化被抑制的效果。由於 *NOT4* 在白色念珠菌中已知與形態生成及致病力有關。為了釐清在白色念珠菌中 Not4 是否經泛素化 Jhd2 造成 H3K4 去甲基被抑制影響標靶基因表現使形態生成及致病力改變。

本計劃之主軸首先是利用實驗室已構築之 Tet-on 載體將 *NOT4* 蛋白質編碼區域選殖入後，送入白色念珠菌後所得之菌株能以四環黴素 (doxycycline) 誘導 Not4 大量產生，觀察 H3K4 甲基化與 *JHD2* 同合子無功能菌株是否具備相似的現象而確認兩者可能作用於同一路徑。

在此計畫中提出下列幾點研究問題：

1. *CaNot4* 的過量表現是否會對白色念珠菌的形態造成影響？
2. *CaNot4* 與 *CaJhd2* 是否有直接的交互作用？
3. *CaJhd2* 是否會受過量表現的 *CaNot4* 所降解？
4. *CaNot4* 的過量表現是否影響 H3K4 的甲基化修飾？

Materials and Methods

計畫主要分為兩部分，一為建構可過量表現 *Not4* 之白色念珠菌品系，觀察對其生長及型態的影響；二為利用酵母菌雙雜合系統 (Yeast Two-Hybrid) 探討 *CaNot4* 和 *CaJhd2* 之關係。

已建構 Tet-on-NIM1-NOT4-e 品系之觀察

過去文獻已知，野生型白色念珠菌培養於 serum 中，可誘導白色念珠菌從酵母菌形態轉變為菌絲形態；而在 *CaNOT4* 均剔除的狀況下培養於 serum 中卻有部分細胞無法被誘導成菌絲形態，因此猜測在 *CaNOT4* 過量表現時，是否能不培養於 serum 中就可誘導細胞形成菌絲。下列為觀察之條件：控制組為 SN95；實驗組為帶有 Tet-on system 的 SN95，分別於 YPD 加四環黴素培養液中觀察 1、3、5、8 和 25 小時之形態變化。另外使用野生型白色念珠菌 SC5314 及帶有 Tet-on system 的 SC5314，分別以 YPD 有無加入四環黴素之培養液進行生長之觀察，持續觀察至 264 小時，每次為三重複，以建立生長曲線圖。

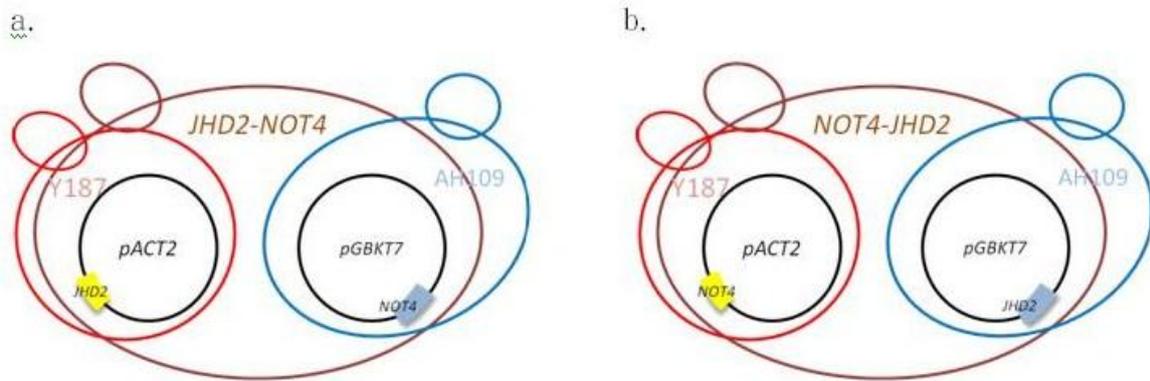
酵母菌雙雜合系統 (Yeast Two-Hybrid)

首先建構帶有 *CaNOT4* open reading frame 的 pACT2-*CaNOT4* 質體，以外加 *NcoI*-HF 和 *Bam*HI 的一對引子利用 PCR 的方式於白色念珠菌基因體中放大 *CaNOT4* 的完整 exon，並把經過限制酶 *NcoI*-HF 和

*Bam*HI 在 37°C 處理過的 *CaNOT4* 片段和 pACT2 以 T4 DNA ligase 於 4°C 環境下進行接合，接著把 ligation 的產物利用 Heat Shock 的方式送入 *E.coli* competent cells 中，用含有 ampicillin 的 LB 培養基選殖，並以定序確認。同時建構 pGBKT7-*CaJHD2* 的部分，是利用先前實驗室所建構的 pACT2-*CaJHD2* 質體，以限制酶 *Xma*I 和 *Xho*I 切下 *CaJHD2* 之片段和 pGBKT7 進行 ligation 後，將產物利用 Heat Shock 的方式送入 *E. coli* competent cells 中，用含有 kanamycin 的 LB 培養基進行選殖，再以定序確認。將建構好的 pACT2-*CaNOT4* 和 pGBKT7-*CaJHD2* 質體以 *C. albicans* electroporation 方式分別送入 *MATa* 釀酒酵母菌 Y187(*trp*⁻) 和 *MATa* 釀酒酵母菌 AH109(*leu*⁻) 後，用 Yeast colony PCR 方式進行初步確認。

另外還需建構 pGBKT7-*CaNOT4* 質體，同樣以外加 *Nco*I-HF 和 *Bam*HI 的一對引子 (同上述) 利用 PCR 的方式於白色念珠菌基因體中放大 *CaNOT4* 的完整 exon，並把經過限制酶 *Nco*I-HF 和 *Bam*HI 在 37°C 處理過的 *CaNOT4* 片段和 pGBKT7 進行接合，送入 *E.coli* 中以含有 kanamycin 的 LB 培養基進行選殖，最後再定序確認。建構好的 pGBKT7-*CaNOT4* 和 pACT2-*CaJHD2* 質體 (先前實驗室建構) 以 *C. albicans* electroporation 方式分別送入 *MATa* 釀酒酵母菌 AH109(*leu*⁻) 和 *MATa* 釀酒酵母菌 Y187(*trp*⁻) 後，用 Yeast colony PCR 的方式進行初步確認。

以上可得到兩組雙雜合(Yeast Two-Hybrid)之菌株 (下圖)，分別為 pACT2-CaNOT4、 pGBKT7-CaJHD2 和 pACT2-CaJHD2、 pGBKT7-CaNOT4。



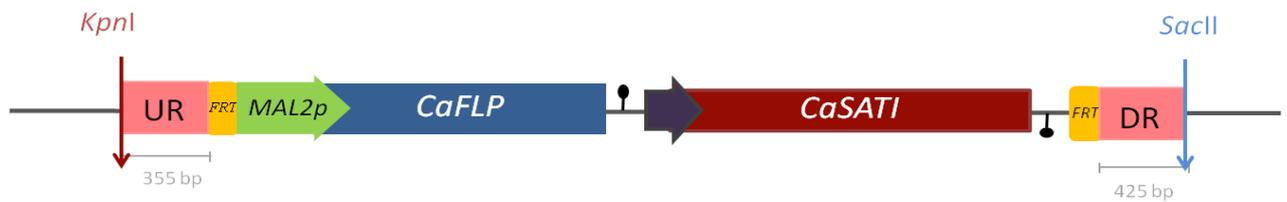
pGBKT7 上帶有能轉譯出 Gal4 activation domain 的序列，而 pACT2 上帶有能轉譯出 Gal4 DNA binding domain 的序列，又其中 Gal4 DNA binding domain 能結合到 GAL UAS element。利用以上原理，若 CaJhd2 與 CaNot4 有交互作用，就可以讓 Gal4 activation domain 啟動下游的 *HIS3*，則菌株可生長在缺乏 leucine、trptophan 和 histidine 的培養基 (SC-leu-trp-his)上，因此可利用 *HIS3* 的表現與否而得知 CaJhd2 和 CaNot4 是否有直接之交互作用。

以 SAT1-flipper 剔除 CaNOT4 兩條等位基因

另外除了以上計畫內容外，也利用 SAT1-flipper 來建立 *Canot4*^{+/−} 及 *Canot4*^{−/−} 的菌株，目的為探討不同菌株的形態差異。以下為詳細步驟：

SAT1-flipper cassette 的前後帶有相同序列的小片段為 *Flp*

recombinase target (FRT)，能被 *Flp* recombinase 所辨識，分別選用兩片段外圍的 4 個切點 *KpnI* 及 *XhoI* 將 *CaNOT4* (~355bp) 上游片段與 *NotI* 和 *SacII* 將 *CaNOT4* (~425bp) 下游片段接入 pSFS2A 載體上，經序列比對無誤後，以 *CaNOT4* 上下游最外兩端的酵素切點 *KpnI* 和 *SacII* 將 cassette 切下 (下圖)，以 *C. albicans* electroporation 方式送入白色念珠菌



SC5314，利用 cassette 上 *CaNOT4* 的上下游片段與白色念珠菌 SC5314 本身的 *CaNOT4* 進行同源互換，進而以 *SAT1*-flipper cassette 將 *CaNOT4* 剔除，cassette 上的 *SAT1* 產物能幫助細胞對抗 nourseothricin (nou.) 抗真菌藥物，使成功互換 cassette 的菌株能存活在含有 nou. 的 YPD 培養基上，以 Yeast colony PCR 方式進行確認；cassette 上另一個基因 *FLP* 的產物 *Flp* recombinase 則能辨識到 *FRT* 序列並將兩個 *FRT* 間的片段給剔除，留下一個 *FRT* 序列；*FLP* 存在可人為調控，利用 maltose 進行誘導的 *MAL2* promoter 之下，以含有 2% maltose 取代 glucose 為碳源的培養液誘導，接著進行選殖，利用 100 µg/ml nou. 確認抗真菌能力已失去，最後得到 *Canot4*^{+/-} 之菌株。後續將重複以上步驟剔除另一條等位基因 *CaNOT4*，得到 *Canot4*^{-/-} 之菌株。

Results and Discussion

針對 *CaNot4* 過量表現下，對白色念珠菌生長及型態上的觀察，發現有無加入四環黴素誘導 *CaNOT4* 過量表現，對其生長並無顯著影響 (Fig.1)。在型態上的初步觀察發現帶有 Tet-on system 的 SN95 實驗組，在加入四環黴素過量表現 *NOT4* 的情況下有 aggregate (聚集) 現象產生 (Fig.2)，猜測可能與生物膜之形成有關，後續將利用野生型白色念珠菌 SC5314 來觀察以確認此結果。

酵母菌雙雜合系統的部分，以得到四種需用之質體：pACT2-*CaNOT4*、pGBKT7-*CaJHD2* 和 pGBKT7-*CaNOT4*、pACT2-*CaJHD2* (實驗室先前已建構)。惟 pACT2-*CaNOT4* 和 pGBKT7-*CaNOT4* 於定序時之結果皆有錯誤，重複建構三次亦如此，且經比對後發現相同質體 (非同批次建構) 的錯誤區序列皆同，因此猜測可能為實驗室所使用之大腸桿菌 DH10B 在送入 pACT2-*CaNOT4* 和 pGBKT7-*CaNOT4* 時有將其發生重組的可能。由於以上因素，原先希望透過酵母菌雙雜合系統來確認 *CaJHD2* 與 *CaNOT4* 有無直接交互作用之構想，可能無法用此方法進行探討。考慮替換方式如下：一為使用其他品系之大腸桿菌以排除重組 *NOT4* 基因的可能性；二為直接改用另一套實驗方法，目前以雙分子螢光蛋白互補系統 (BiFC, Bimolecular fluorescence complementation) 為優先選擇。

以 SAT1-flipper 剔除 *CaNOT4* 兩條等位基因，主要是希望比較 SC5314 (wild type)、*Canot4*^{-/-}、*Cajhd2*^{-/-} 和 *not4* & *jhd2* double delete 四

種菌株之形態差異，以便確立 *CaNOT4* 及 *CaJHD2* 在功能上何者具上位性(epistasis)。目前已得到 *Canot4*^{+/-} 和 *Canot4*^{-/-} 之突變株 (Fig.3.4)，會以南方點墨法確認基因組是否被改造為預期的構造，後續將利用實驗室先前建構的 *Cajhd2*^{-/-}，用相同方式再剔除 *NOT4* 兩條等位基因，以得到 *not4 & jhd2* double delete 菌株。

Acknowledgements

在此感謝國家科學委員會資助本計畫，以及謝家慶老師和實驗室成員的協助和指導，雖然本結案報告尚未解決先前計畫中設立之部分問題，但透過本計畫的進行，在實驗技術上學習到許多，並增進了研究設計的邏輯與蒐集、整合、參考文獻資料的能力，對未來繼續在此領域學習與白色念珠菌之相關知識有相當大的幫助。

Figure 2.

SN95 及帶有 Tet-on system 之 SN95 型態觀察。最下排為 control 組(SN95)，17、19 和 20 為帶有 Tet-on system 的三種 isolates，於 YPD 加入四環黴素之培養液中分別觀察 1、3、5、8 及 25 小時的型態變化。

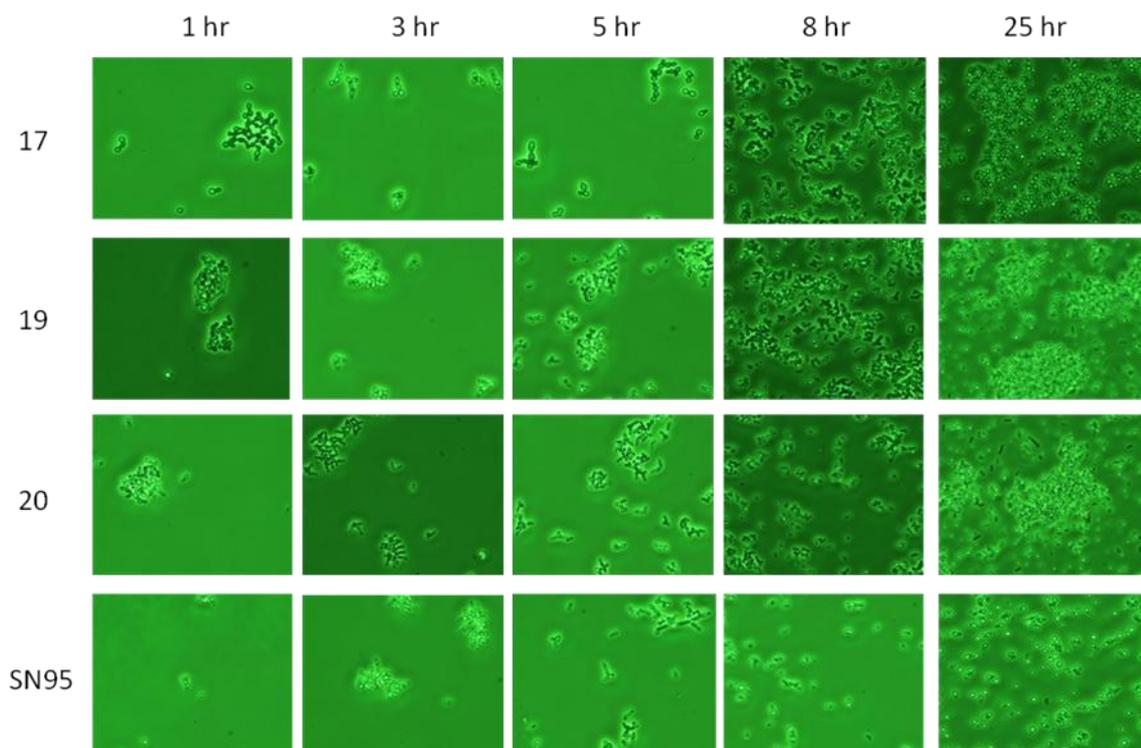


Figure 3. 已得到之 *Canot4*^{+/}- (左圖) 和 *Canot4*⁻- (右圖) 之突變株。

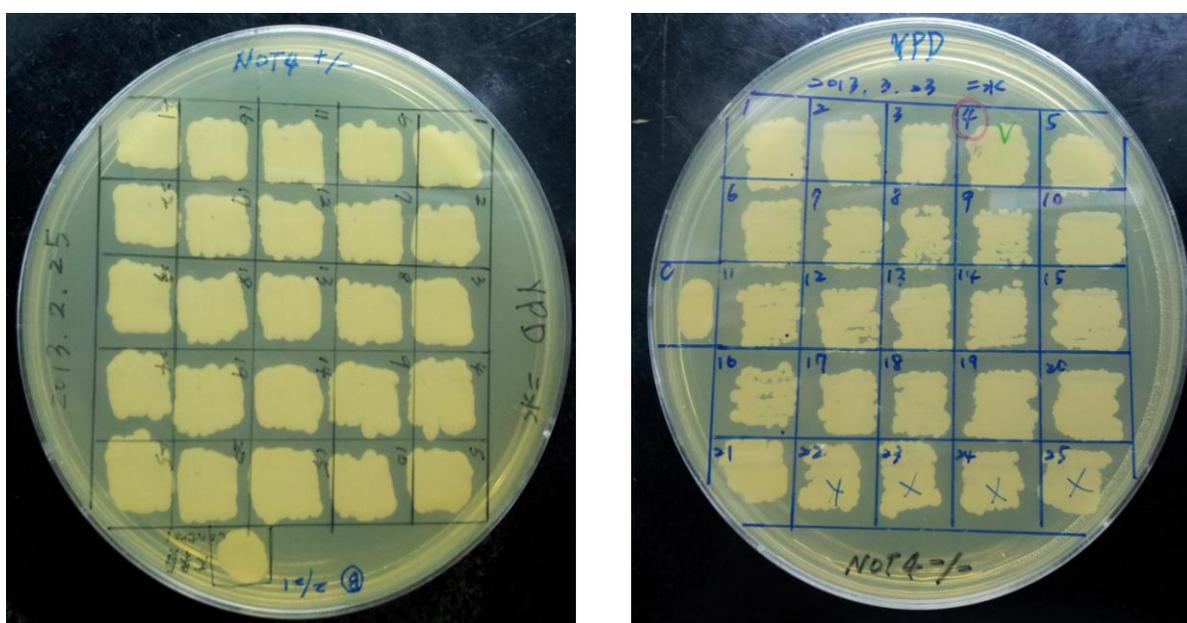
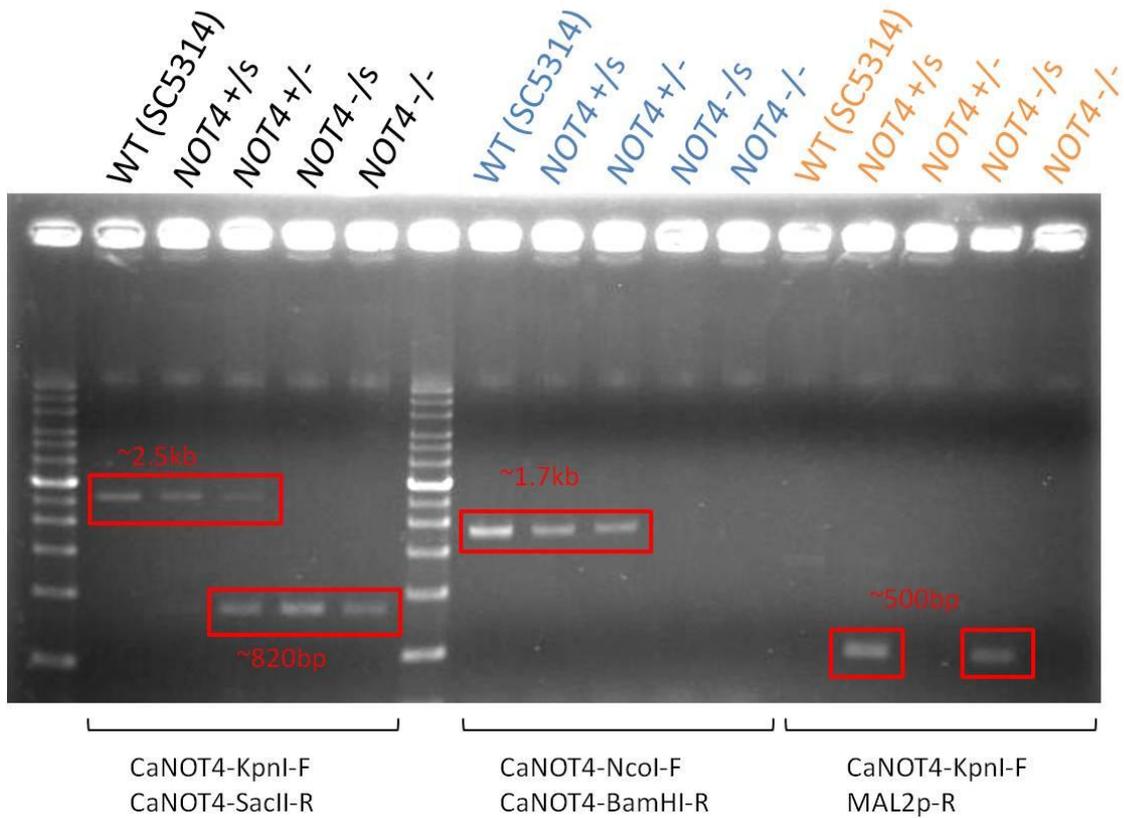


Figure 4. 此圖為確認 *CaNOT4* 剔除之狀況，分別以三對設計之引子來進行。



第一組 primers 為 CaNOT4-KpnI-F 和 CaNOT4-SacII-R，分別位於 *NOT4* coding region 的上下游片段，因此若存在 *NOT4* 基因會得到約 2.5kb 片段；*NOT4* 基因若已被剔除則會得到約 820bp (只含上下游和 *FRT*) 的大小。

第二組使用一對位於 *NOT4* coding region 頭尾的 primers，分別是 CaNOT4-NcoI-F、CaNOT4-BamHI-R，會夾出 *NOT4* 基因大小約為 1731bp。

第三組 primers 為 CaNOT4-KpnI-F、MAL2p-R (*SATI*-flipper 的 *MAL2* promoter 上)，存在 *SATI*-flipper cassette 的會得到約 500bp 之片段，如 *NOT4*+/s、*NOT4*-/s。
(*NOT4*+/s, s 代表 *SATI*)

References

- Douglas P. Mersman, Kayla M. Harmeyer, and Scott D. Briggs.**(2009). To be or NOT to be demethylated .*Cell cycle* 8(14)2135-2137.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhauser, J. (2004).** The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341, 119-127.
- Solmaz Sobhanifar** (2003). Yeast Two Hybrid Assay: A Fishing Tale. *BioTeach Journal* 81-88 .
- Atir-Lande, A., Gildor, T., and Kornitzer, D. (2005).** Role for the SCFCDC4 ubiquitin ligase in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell* 16, 2772-2785.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006).** Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.
- Berman, J., and Sudbery, P.E. (2002).** *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3, 918-930.
- Shilatifard, A., Shiekhattar, R., and Berger, S.L. (2007).** Histone H3 K4 demethylation during activation and attenuation of GAL1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 7856-7864.
- Liang, G., Klose, R.J., Gardner, K.E., and Zhang, Y. (2007).** Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nat Struct Mol Biol* 14, 243-245.
- Krueger, K. E., A. K. Ghosh, et al. (2004).** "Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*." *Microbiology* 150(Pt 1): 229-240.
- Mersman, D. P., H. N. Du, et al. (2009).** "Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression." *Genes Dev* 23(8): 951-962.
- Sudbery, P., N. Gow, et al. (2004).** "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." *Trends Microbiol* 12(7): 317-324.