

# 科技部補助

## 大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 : 闡明 GPH1 在白色念珠菌連結 HOG 路徑及經 CDC4 影響 \*  
\* 名稱 : 的形態生成所扮演的角色 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 謝伯思  
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-015-B  
研究期間： 102年07月01日至103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 103年03月19日

# Abstract

白色念珠菌(*Candida albicans*)為一種伺機性真菌病原菌，主要具有三種不同的型態，並且於許多研究中發現白色念珠菌的型態轉變與致病力有存在一定的相關性。

已知 *CDC4* 在 *S. cerevisiae* 中為必要基因，且為一泛素化蛋白質。但在 *C. albicans* 中卻為非必要基因且扮演其菌絲型態的負調控者。當失去了 *CDC4* 的表現時，白色念珠菌的形態會轉變為菌絲形態。在先前的實驗中運用了親合力蛋白質純化法找出與白色念珠菌 *Cdc4* 相關的蛋白質 *Gph1*，並透過 yeast two-hybrid 證實 *Gph1* 與 *Cdc4* 之間有交互作用，而後續的實驗也證實持續表現 *CaGPH1* 能部分遏止因失去 *CaCDC4* 造成的菌絲生成。另外，*Pbs2* 是 High-Osmolarity Glycerol (HOG) pathway 的一員，位於 *Hog1* 的上游，可調控 *Hog1* 的活性，在白色念珠菌能影響 *CaGPH1* 表現。本實驗將針對 *Pbs2* 進行調控以達到調控 HOG pathway 之目的。

藉由本實驗將建構可大量表現過度活化的 *PBS2<sup>DD</sup>* 菌株，分析其 *GPH1* 的生合成量以及其形態轉變。另外，建構可大量表現 *GPH1* 以及可降低 *CDC4* 表現量之菌株，觀察其交互作用以及型態轉換。

然而，結果並非如同預期。*ScPBS2<sup>DD</sup>* 與 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 雖為同源基因，但所造成的影響卻有所出入。文獻中提及 *PBS2<sup>DD</sup>* 於 *S. cerevisiae* 可成功促使下游基因持續活化進而促使 HOG pathway 過度活化造成死亡，但由實驗結果得知 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 並無法成功使 HOG pathway 過度活化進而造成菌絲死亡，而對於型態上也並未促使產生明顯差異。另外，大量表現 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 也並未使 *GPH1* 的生合成量有所改變。後續將進一步探討其原因以及實驗方向。

# Introduction

白色念珠菌(*Candida albicans*)為一種伺機性真菌病原菌，主要具有三種不同的型態。其主要分布於腸胃道和泌尿道的黏膜表皮上，為正常的共生菌種，然而，當患者免疫功能低下時，白色念珠菌伺機大量繁殖，常導致皮膚表面跟全身性的疾病。然而在現今的抗真菌藥物的使用上，白色念珠菌的抗藥性問題日趨嚴重。已得知型態的生成與白色念珠菌的致病力具有一定的相關性，因此，針對白色念珠菌之型態轉變的過程進行研究，將有助於對白色念珠菌感染的控制，以達到預防抗藥性菌株之隱患。

已知 *CDC4* 在 *S. cerevisiae* 中為必要基因，且為一泛素化蛋白質。但在 *C. albicans* 中卻為非必要基因且扮演其菌絲型態的負調控者。當失去了 *CDC4* 的表現時，白色念珠菌的形態會轉變為菌絲形態(Atir-Lande et al., 2005)。因此，實驗室在先前運用了親合力蛋白質純化法找出與白色念珠菌 *Cdc4* 相關的蛋白質 *Gph1*，並透過 yeast two hybrid 證實 *Gph1* 與 *Cdc4* 之間有直接交互作用，確立了兩者功能的相關性(Tseng et al., 2010)。重要的是，實驗室先前研究顯示，持續表現 *C. albicans GPH1* (*CaGPH1*) 能部分遏止因失去 *CaCDC4* 造成的菌絲生成，確認 *CaGPH1* 與 *C. albicans* 形態生成有關。

*S. cerevisiae GPH1* (*ScGPH1*) 為必要基因，產物為醣原的去磷酸酶 (glycogen phosphorylase)能將肝醣分解為葡萄糖調控醣類的代謝，且與逆境環境反應的調控具有相關性(Favre et al., 2008)；*GPH1* 和逆境反應 High-Osmolarity Glycerol (HOG)訊息路徑之成員 *HOG1* 功能相關性已經證實(Sunnarborg et al., 2001)。微陣列研究顯示，在 *C. albicans* 中 *CaGPH1* 的轉錄表現是依賴與 HOG 訊息路徑。此外，先前實驗室研究顯示 *CaGPH1* 在 *C. albicans* 為非必要基因，然而其醣類的代謝尚未被確立。

另外，Pbs2 是 high-osmolarity glycerol (HOG) pathway 的一員中 MAP kinase kinase，位於 MAP kinase Hog1 的上游，可調控 Hog1 的活性。文獻指出，擬磷酸化的 Pbs2<sup>DD</sup> 過量表現在缺乏 *PBS2* 同源基因 *wis1* 的裂殖酵母菌 *Schizosaccharomyces pombe* 能挽救細胞週期缺失，而在釀酒酵母菌 *Saccharomyces Cerevisiae* 中若 HOG 路徑過度活化會造成菌株的死亡，此致死現象可藉細胞周期 G1-to-S 期轉換必要轉換者 *CDC4* 的缺失而抑制。

## Rationale

根據先前實驗結果且依據文獻顯示 *GPH1* 可能是 HOG 路徑的標的基因，因此，想了解 *GPH1* 在白色念珠菌連結逆境環境反應 HOG 訊息路徑及經 *CDC4* 影響的形態生成所扮演的角色，將分別針對 *CaGPH1* 以及 *CaPBS2* 進行基本研究，瞭解其生化特性進而推估其二者間以及其二者與 *CaCDC4* 之間的關連性，以便確立 *CaCDC4* 所影響的形態生成與 HOG 路徑所影響的逆境反應是藉 *CaGPH1* 進行交互作用。本計畫將先針對下列研究問題進行研究。

1. *CaPBS2* 及 *CaGPH1* 在白色念珠菌中扮演的角色是否與 *S. cerevisiae* 同源基因相似？
2. *CaPBS2* 過量表現對 *CaCDC4* 表現缺乏所造成的菌絲現象是否更具顯著抑制能力？
3. *CaGPH1* 表現是否藉 HOG 路徑經 *CaPBS2* 執行轉錄調節？

# Material and Method

## 1. Synthetic oligonucleotides used in this study

Name	Sequence
pNIM1 _ inteF	5' -CATGTCAAAGGATTCAAC-3'
pNIM1 _ inteR	5' -GTATGGTGCCTATCTAAC -3'
PBS2-T359D-R	5' - GACAACCAATATTATCTTTGGCTAA -3'
PBS2-T359D-F	5' - TTAGCCAAAGATAATATTGGTTGTC -3'
PBS2-S355D-R	5' - ATCGGCAACTAAATTACCAGAC -3'

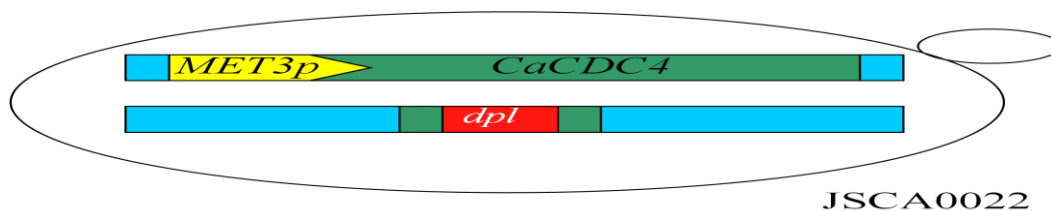
## 2. 使用菌株(strains)

1.1 *E. coli* (10B )

1.2 *Candida albicans*

*SC5314* wild type

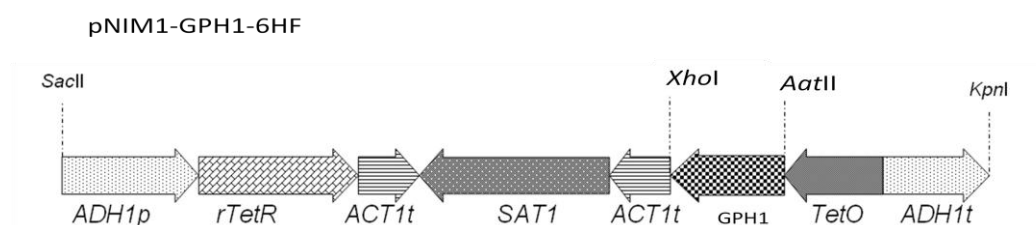
*JSCA0022* 白色念珠菌營養缺陷型 帶有一可調控 *CDC4* 表現的開關



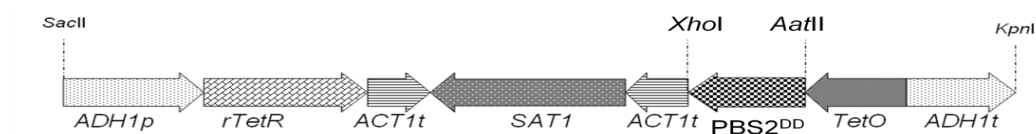
## 3. 質體

yT&A- PBS2<sup>DD</sup>

pNIM1-GPH1-6HF



pNIM1-PBS2<sup>DD</sup>-6HF



## 4. 培養液及培養基

YPD medium 、 YPD agar plate 、 YPD + Nou. agar plate 、 YPD + 0.6M KCL medium 、 Minimal medium ( SD ( Synthetic Dextrose)) + Uracil + Arginine + Histidine 、 SD + Ura + Arg + His agar plate 、 SD + Ura + Arg + His + Nou. agar plate 、 SD + Ura + Arg + His + 2.5 mM Met/Cys medium 、 SD + Ura + Arg + His + 0.6M KCL medium

## 5. 生長環境

5.1 E.coli (10B) : 37°C Incubate

5.2 Candida albicans : 30°C Incubate

## 6. 藥品

Restriction enzyme 、 BSA 、 TAE buffer 、 T4 DNA ligase 、 polymerase (Taq polymerase 、 Pfu polymerase 、 UltraIIPfu polymerase 、 2mM dNTP )

## 7. PCR (Polymerase chain reaction) 聚合酶連鎖反應：

加入酵素 buffer 、 dNTP 、 primer-forward 、 primer-reverse 、 DNA 模板(DNA template) 、 DNA 聚合酶(DNA polymerase) 。利用溫度的不同使 DNA 進行變性(denature) 、黏接(annealing) 、延展(extension)等過程，進行多次循環過程，使得 DNA 特定片段大量複製。

## 8. 膠體電泳

利用 DNA 帶負電的特性，使 DNA 在電場的作用下會往正極移動，而移動的速度與其分子量大小成反比，進而分離出不同分子量的 DNA 片段。

## 9. 限制酶反應

將經 PCR 放大過的大量帶有特定限制酶切點的 DNA 片段(insert) ，與載體(vector)分別以限制酶進行反應，使 DNA 片段(insert)與載體(vector)兩端具互補序列，得以配對。反應溫度與時間視各限制酶特性而定。

## 10. 抽質體

利用 Gene-spin kit 以抽取質體。

## 11. T4 PNK、T4 Ligation:

由於 PCR 之產物為片段而非環狀，需利用 T4 PNK 在產物片段外加磷酸以及 T4 Ligation 兩種方式使其形成環狀結構。將完成突變之片段加入 1.5  $\mu$ l T4 PNK、3  $\mu$ l T4 ligase buffer(以便 ligation 之步驟)，利用 PCR machine 進行 37°C 30 min、65°C 20 min 之反應，在 PCR 得出的片段之 5'端上給予磷酸根，使片段有能力進行 Ligation。結束後加入 1.5  $\mu$ l T4 ligase、3  $\mu$ l T4 ligase buffer 在 4°C 下反應 overnight，最後可得質體。

## 12. E.coli 轉殖 (Transform)

將突變完成之質體轉殖入大腸桿菌製備出的勝任細胞中。從 -80°C 冰箱中取出勝任細胞等至半融時，加入 10  $\mu$ l 質體放置在碎冰上 30 分鐘，隨後置入 42°C incubator 中 2 分鐘，取出後即刻冰水 10 秒，放回冰上 2 分鐘後放入 37°C incubator 中 1 小時，最後均勻塗抹於 LB agar plate 上，於 37°C incubator 中培養 16 小時。

## 13. 亮度比

經過膠體電泳後，瓊膠上 sample 訊號的亮度會和濃度成正比，可大略推估 insert 和 vector 的濃度比，再搭配 insert 和 vector 的分子量大小以計算兩者的莫耳數比。

## 14. 定序

質體經由限制酶反應初步確認後，會送至源資生技公司定序。

[oligo@tri-ibiotech.com.tw](mailto:oligo@tri-ibiotech.com.tw)

## 15. Yeast Transformation 轉形 (yeast)

### 製備勝任細胞(competent cell)

測白色念珠菌之菌液 O.D 值，得知其菌量，離心將菌收集，加入 8 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 沖散 pellet，再加入 1 ml 10x TE，1 ml 10x Lithium acetate，置入 30°C incubate、150 rpm 培養 60 min，再加入 DTT 250  $\mu$ l 再置入 30°C incubate、

150 rpm 培養 30 min，接著加入  $d_2H_2O$  至滿， $4^\circ C$ 、5000 rpm 條件下離心 5 min，再以 25 ml ice-cold  $d_2H_2O$  沖洗 pellet， $4^\circ C$ 、5000 rpm 條件下離心 5 min，加入 5 ml ice-cold sorbitol 沖洗 pellet， $4^\circ C$ 、5000 rpm 條件下離心 5 min。最後加入 50  $\mu l$  ice sorbitol 完成勝任細胞的製作，取 40  $\mu l$  勝任細胞，與適量 cassette 混合，進行電穿孔。

### **電穿孔(Electroporation)**

利用短促而強烈的電擊處理勝任細胞，使勝任細胞之膜產生小孔洞，進而送入 DNA 片段。置入  $30^\circ C$  incubate、150 rpm 回養 4 小時。離心並去除些許上清液，將剩餘液體與勝任細胞混合均勻，塗盤在有加抗生素作為篩選機制的培養皿上。置入  $30^\circ C$  incubate 約 2~3 天。

## **16. Southern blot (南方點墨法)**

抽取菌株之 genomic DNA，並加以合適的限制酶作用 16 小時。以電壓 100 伏特跑膠，泡於 EtBr，藉以得知限制酶是否作用完全。將膠泡於 HCl 使其打斷較大的 genomic DNA，再泡於 Denaturation Solution 使 genomic DNA 變性，最後泡於 Neutralization Solution 使之恢復中性。將膠泡於 transfer buffer 中準備進行轉漬。(架設 Rapid Downward Transfer System 系統，由下往上放置衛生紙、3MM-paper、潤濕過的 3MM-paper、轉印模、電泳膠、潤濕過的 3MM-paper、潤濕過的鹽橋，至隔日。)

轉漬完成後，將轉漬膜放上潤濕過的 3MM-paper 進行 UV cross-link 2~4 次。轉漬膜加入  $42^\circ C$  的 DIG Easy Hyb 於  $42^\circ C$  水浴槽 30 min。加入單股探針，於  $42^\circ C$  水浴 16hr。

雜交完成後，以 SSC/SDS 於室溫洗 5 min， $60^\circ C$ 洗 15 min 皆兩次。之後進行 detection (washing buffer  $\rightarrow$  blocking solution  $\rightarrow$  antibody solution  $\rightarrow$  washing buffer  $\rightarrow$  detection buffer  $\rightarrow$  CSPD)，利用壓片觀察結果。



## 17. RT-PCR

抽取 RNA，並將 RNA 加入 oligo dT、10M NTP、DEPC water 以 65°C 作用 5 分鐘，再置於冰上作用 3 分鐘。為了破壞 RNA 的二級結構以及避免 reannealing，再以 5x first-stand buffer、0.1M DTT、RT enzyme 於 42°C 作用 60 分鐘、72 °C 作用 15 分鐘後即完成 RNA-DNA 狀態的 cDNA。

以 cDNA 做為模板進行 PCR 的反應。

## 18. Western blot analysis (西方點墨法)

### Protein 製備：

菌液離心，取得一定數量的 pellet 加入經酸處理過後的玻璃珠以及適量的 lysis buffer for *C. albicans* ( 1ml lysis buffer、20  $\mu$ l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、10  $\mu$ l PMSF、0.8  $\mu$ l  $\beta$  ME、1  $\mu$ l Protease inhibitor )，vortex 1 min 後置於冰上 30 sec 重複五次，利用在 eppendorf 底部穿刺及離心分離玻璃珠及 cell lysates，將 cell lysates 於 4°C、13000 rpm 條件下離心 20 min，取其上清液。將蛋白質定量，取出適當體積的 protein 加入 5x sample buffer dye 於 98°C 作用十分鐘，冰上十分鐘。

### 蛋白質膠體電泳(SDS-PAGE)：

製備 SDS gel (下膠: 4 ml  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ 、3.3 ml 3% acryamide、2.5 ml 1.5 M Tris、100  $\mu$ l 10% APS、100  $\mu$ l 10% SDS、8  $\mu$ l TEMED；上膠: 3.4 ml  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ 、830  $\mu$ l 3% acryamide、630  $\mu$ l 1 M Tris、50  $\mu$ l 10% APS、50  $\mu$ l 10% SDS、10  $\mu$ l TEMED)，loading sample 後以 80 伏特 30 min，100 伏特 80 min 的條件跑膠，transfer 到 PVDF membrane 以 100 伏特 90 min 的條件進行，其中 membrane 要事先以甲醇活化(transfer 架設由黑面至白面依序為海綿、paper、gel、membrane、paper、海綿)，blocking 1 hr，wash 5 min 重複 3 次，進行 1<sup>o</sup> 抗 overnight。

隔日 wash 5 min 重複 3 次，利用 2° 抗偵測 1° 反應 1 hr，wash 5 min 重複 3 次，呈色，利用冷光儀照相分析。

## 19. 顯微鏡觀察

利用三眼相位差顯微鏡，以 10 x 40 倍率於明視野下觀察菌液之細胞型態。

## 20. Glycogen assay

適當條件下培養後，收菌約  $1 \times 10^8$  cells (約 10 OD)，12000 rpm，spin 2 min。清除上液後以 PBS wash，12000 rpm，spin 2 min，再以 ice-cold  $d_2H_2O$  wash 2~3 次，spin 2 min/次。之後加入 1 ml 40 mM Sodium acetate (ph 4.8) 沖散 pellets，煮 5 min 再置於冰上 5 min 後 vortex(30 sec vortex → 30 sec on ice)x12 次。以 4°C，10000 rpm，spin 20 min，取上清液至新的 eppendorf，混合均勻後取 125  $\mu$ l 至新的 eppendorf 中，再加入 30.5  $\mu$ l amyloglucosidase (葡萄糖澱粉酶)，57°C incubate 16 hr。最後利用 glucose assay kit 測 glucose 的濃度，當作 glycogen 的多寡參考的依據。(Usher et al., 2009)

---

## 實驗大略流程如下

為了探討 *GPH1* 在白色念珠菌連結 HOG 路徑及經 *CDC4* 影響的形態生成所扮演的角色，首先**1.** 建構四環黴素基因調控系統(Tet-on)，可在具有 doxycycline 的條件下持續大量表現 *CaGPH1*，於以營養缺乏菌株為親本剔除一條 *CaCDC4* 對偶基因，另一條則置於 MET3 promoter 調控:可藉由環境中含有 2 mM methionine 甲硫胺酸、cysteine 半胱氨酸的情況下使啟動子關閉。藉此菌株**2.** 觀察觀察 *CaGPH1* 與 *CaCDC4* 在不同的培養條件下，調控 Tet-on 系統以及 MET3 promoter 以觀察菌株型態的變化。為得知 *CaGPH1* 表現是否藉 HOG 路徑經 *CaPBS2* 執行轉錄調節，**3.** 建構四環黴素基因調控系統(Tet-on)，可在具有四環黴素 doxycycline 的條件下，持續大量表現改造後能表現過度活化的 *CaPBS2<sup>DD</sup>* (S355, T359 to D355, D359)菌株於一以營養缺乏菌株為親本剔除一條 *CaCDC4* 對偶基因，另一條則置於 MET3 promoter 調控之菌株以及野生型 *SC5314*。藉由建構好之菌株**4.** 觀察大量表現過度活化的 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 菌株與野生型兩者間，是否具有型態變化的差異，以及在大量表現過度活化的 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 情況下，*CaGPH1* 的表現量是否受到影響。另外，**5.** 調控菌株內 *CaGPH1* 的表現，偵測肝醣累積量的變化，以研究 *CaGPH1* 在白色念珠菌中扮演的角色是否如同於 *S. cerevisiae*。

# Result

## 1. 確認 Tet-on system 有成功促使 *CaGPH1* 表現量上升。

建構帶有 *CaGPH1* 的四環黴素基因調控系統之質體(圖一)。以電穿孔的方式將帶有 *CaGPH1* 的四環黴素基因調控系統的 Cassette 利用同源互換的原理送入以營養缺乏菌株為親本剔除一條 *CaCDC4* 對偶基因，另一條則置於 MET3 promoter 調控之 *JSCA0022* 菌株中(圖二)。成功送入 cassette 的菌株能存活於含有 nourseothricin 的培養基上。

以 pNIM1\_inteF 和 pNIM1\_inteR 進行 colony PCR 初步確認結構符合預期(圖三)，挑取 colony 進行 WesternWestern blotting analysis。以 WesternWestern blotting analysis 的方式確認菌株在蛋白質表現層次加入 doxycycline 誘導相較於未加入 doxycycline 誘導有較多 *CaGPH1* 的表現量。(圖四)

## 2. *CaGPH1* 與 *CaCDC4* 在不同的培養條件下，菌株型態無明顯差異。

四環黴素基因調控系統在具有 doxycycline 的情況下會開啟，可大量表現 *CaGPH1*，而 MET3 promoter 在環境中含有 2 mM methionine 甲硫胺酸、cysteine 半胱氨酸的情況下被關閉，使 *CaCDC4* 表現量下降。

藉由調控 Tet-on 系統以及 MET3 promoter 以觀察菌株型態的變化。觀察單一調控 Tet-on system 調控 *CaGPH1* 的表現量所造成的菌株型態的差異、單一調控 MET3 promoter 調控 *CaCDC4* 表現量所造成的菌株型態的差異、以及同時調控此二者所造成的菌株型態的差異。然而，並未看到菌株型態有何明顯差異。(圖五)

3. 確認 Tet-on system 有成功促使  $PBS2^{DD}$  表現量上升，但其下游基因表現卻未受到活化。

以 PBS2-T359D-R 及 PBS2-T359D-F 進行第一次 PCR，再以 PBS2-T359D-F 及 PBS2-S355D-R 進行第二次 PCR，建構出帶有突變可表現過度活化的  $PBS2^{DD}$  片段，並將此基因片段利用限制酶位點置入四環黴素基因調控系統之質體(圖六)。以電穿孔的方式將帶有帶有  $CaPBS2^{DD}$  的四環黴素基因調控系統的 cassette 利用同源互換的原理送入以營養缺乏菌株為親本剔除一條  $CaCDC4$  對偶基因，另一條則置於 MET3 promoter 調控之  $JSCA0022$  菌株中(圖七)，以及野生型  $SC5314$ 。nou. 可初步篩選 cassette 是否被送入菌株內。

以 pNIM1\_inteF 和 pNIM1\_inteR 進行 colony PCR 初步確認此菌株被改造(圖八)，另以 Southern 確認 DNA 結構(圖九)，再以 Western blotting analysis 的方式確認菌株在蛋白質表現層次加入 doxycycline 誘導相較於未加入 doxycycline 誘導有較多過度活化的  $PBS2^{DD}$  的表現量(圖十)。

另外，由於  $PBS2^{DD}$  為 HOG pathway 的一員，因此以已知可誘導 HOG pathway 之環境壓力處理樣品，並進一步以 Western blotting analysis 偵測  $PBS2^{DD}$  之下游蛋白是否有被成功誘導進而保持持續活化狀態。

由結果顯示，以 tet-on system 使  $PBS2^{DD}$  表現並不足以使下游 Hog1 持續保持活化(圖十)。

4.大量表現過度活化的  $CaPBS2^{DD}$  菌株與野生型兩者間，型態變化無明顯差異且  $CaGPH1$  的表現量也未受明顯影響。

四環黴素基因調控系統在具有 doxycycline 的情況下會開啟，可大量表現過度活化的  $PBS2^{DD}$ ，而 MET3 promoter 在環境中含有 2 mM methionine 甲硫胺酸、cysteine 半胱氨酸的情況下被關閉，使  $CaCDC4$  表現量下降。

藉由調控 Tet-on 系統以及 MET3 promoter 以觀察菌株型態的變化。觀察單一調控 Tet-on system 調控過度活化的 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 的表現量所造成的菌株型態的差異、單一調控 MET3 promoter 調控 *CaCDC4* 表現量所造成的菌株型態的差異、以及同時調控此二者所造成的菌株型態的差異。

然而 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 並未如同 *PBS2<sup>DD</sup>* 在 *S. cerevisiae* 所造成的影響，在型態上並無明顯變化(圖十一)，且由 RT-PCR 的結果顯示，大量表現 *PBS2<sup>DD</sup>* 於 RNA 的層次並未促使 *GPH1* 的表現量有明顯變化(圖十二)。

#### 5. 調控菌株內 *CaGPH1* 的表現，其肝醣累積量的並無明顯差異。

參照文獻的方式，分別偵測野生型 *SC5314*，實驗室以建構完成之剔除 *CaGPH1* 兩條對偶基因 *CaGPH1*<sup>-/-</sup>，實驗室已建構完成之 Tet-on *CaGPH1* 於野生型 *SC5314*，此三種菌株。其中，Tet-on *CaGPH1* 分為加入 doxycycline 誘導組以及沒有加入 doxycycline 的控制組。

Glucose assay kit 會偵測到從肝醣水解而來的 glucose-1-P，可間接得知菌株內肝醣累積量。由於 *GPH1* 在 *S. cerevisiae* 中為必要基因，產物功能為調控醣類的代謝，但在 *C. albicans* 中卻為非必要基因，其產物功能在 CGD (Candida Genome Database) 中的描述中被推測為醣原的磷酸酶(glycogen phosphorylase)，因此預期 *CaGPH1*<sup>-/-</sup> 肝醣累積量相較於 *SC5314* 多，而 Tet-on *CaGPH1* 肝醣累積量相較於 *SC5314* 少(圖十三)。

然而，原本推測當大量表現 *CaGPH1* 會促使肝糖量下降，而 *CaGPH1*<sup>-/-</sup> 菌株內肝醣會累積，但結果不如預期，未來將參考文獻設計培養條件。

# Discussion

1. *CaPBS2* 及 *CaGPH1* 在白色念珠菌中扮演的角色是否與 *S. cerevisiae* 同源基因相似？

由實驗結果顯示，雖為同源基因，但所造成的影響卻有所出入。文獻中提及 *PBS2<sup>DD</sup>* 於 *S. cerevisiae* 可成功促使下游基因持續活化進而促使 HOG pathway 過度活化造成死亡，然而在 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 並無法成功使 HOG pathway 過度活化進而造成菌珠死亡。另外，*GPH1* 於 *S. cerevisiae* 與醣類調控相關性，然而，對 *CaGPH1* 受到調控的菌株進行分析，並無發現其肝醣生成量有因 *CaGPH1* 受到調控而有所差異。

2. *CaPBS2* 過量表現對 *CaCDC4* 表現缺乏所造成的菌絲現象是否更具顯著抑制能力？

由實驗結果顯示，觀察其型態變化，*CaPBS2<sup>DD</sup>* 過量表現對 *CaCDC4* 表現缺乏所造成的菌絲現象上並無明顯抑制現象。

3. *CaGPH1* 表現是否藉 HOG 路徑經 *CaPBS2* 執行轉錄調節？

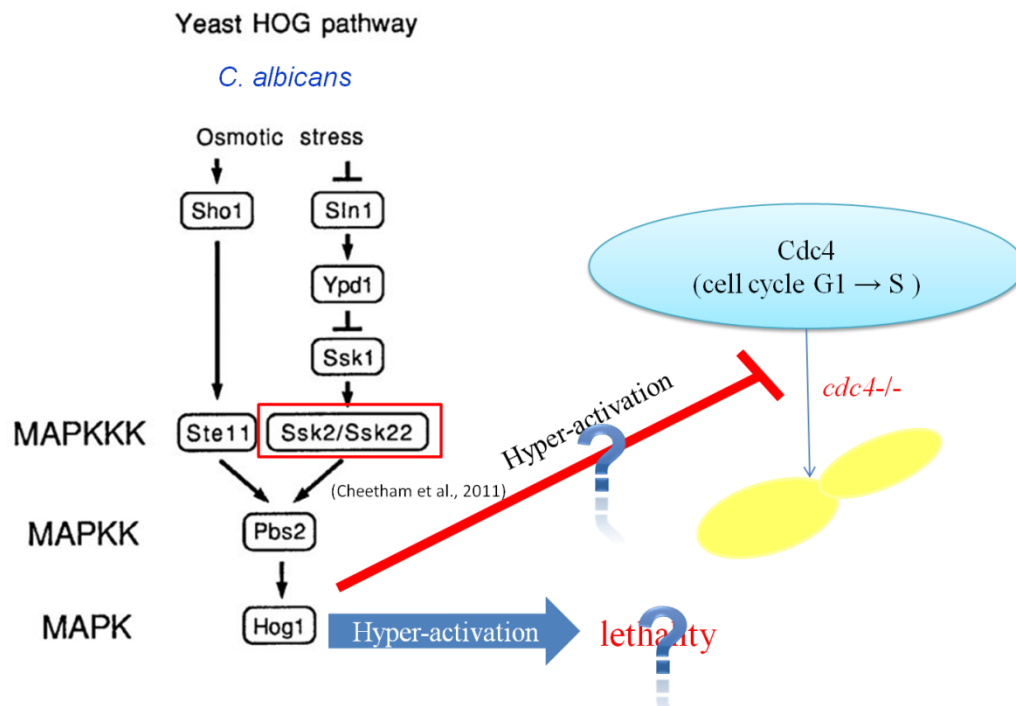
由實驗結果顯示，*CaGPH1* 並未受 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 之調節，因此推估並非經由 *CaPBS2* 執行轉錄調節。

型態上，*PBS2DD* 過量表現並不會造成菌株產生明顯型態變化，由此可以推估 *S. cerevisiae* 以及 *C. albicans* 之間，HOG pathway 及醣類代謝的調節有所差別。

由一系列實驗結果得知，*PBS2DD* 過量表現並無成功誘導 HOG pathway 過量表現，由此推測其與 *S. cerevisiae* 不同的原因可能為 1. *CaPBS2<sup>DD</sup>* 之點突變並不足以模擬真正 *CaPBS2* 受到磷酸化的狀況，以至於無法活化 HOG pathway，2. Tet-on 系統所調控產生的 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 之產量並不足以促使 Hog1 持續磷酸化，3. 存在其它的激酶調節 Hog1 磷酸化。

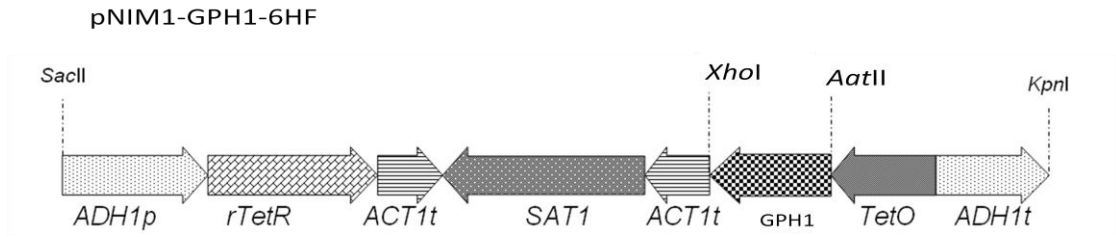
# Future work

未來將再參考文獻，選取 *CaPBS2<sup>DD</sup>* 之上游 *CaSSK2* 進行實驗，期望改以調節 *CaSSK2* 的方式成功促使 HOG pathway 過度活化，進而再去探討 HOG pathway 與 *GPH1* 及 *CDC4* 間的關係。

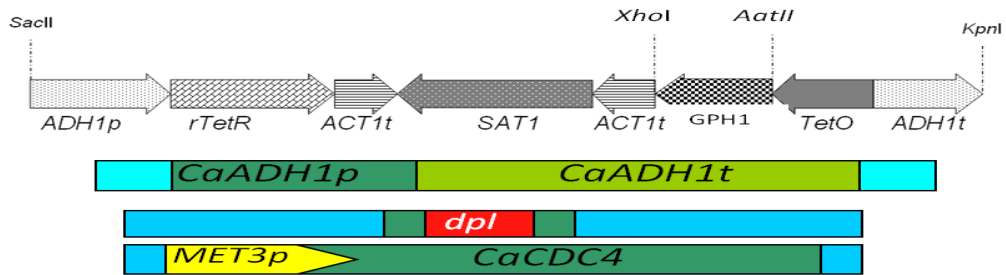




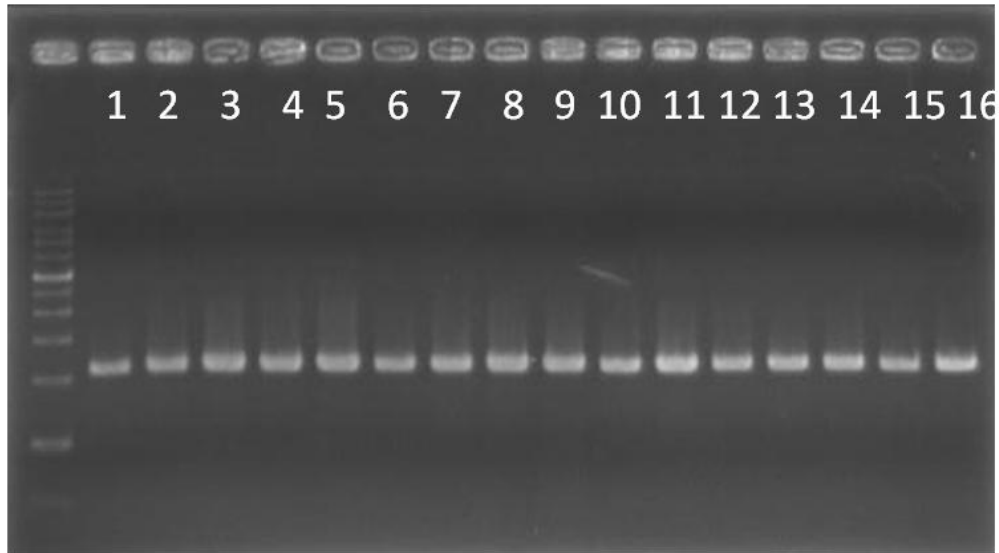
# Figure



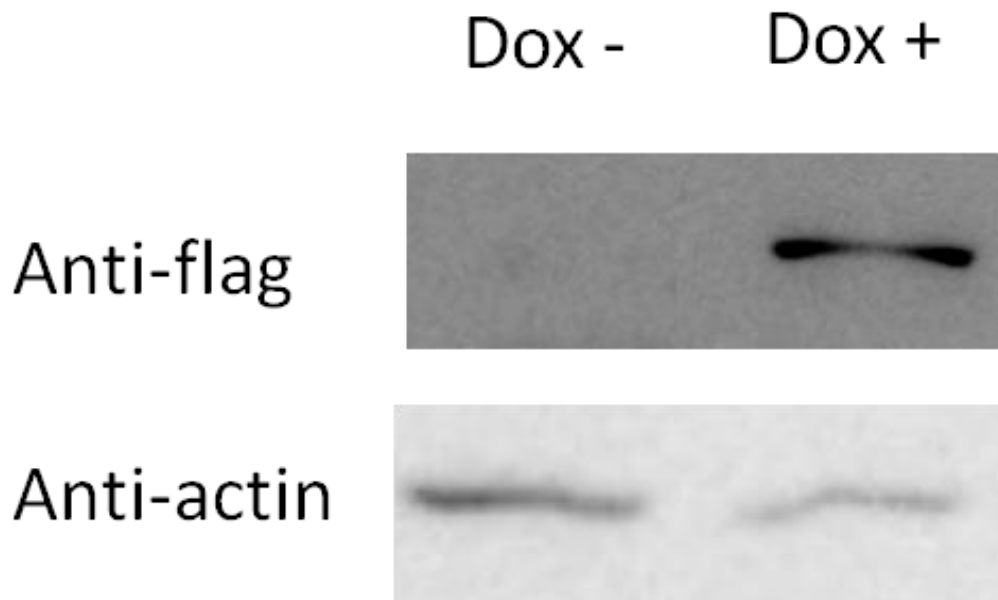
圖一 帶有 *CaGPH1* 的四環黴素基因調控系統之質體。帶有 *CaGPH1* 的四環黴素基因調控系統的 cassette 上，*SAT1* 的產物能幫助細胞抵抗 nourseothricin (nou.) 抗真菌藥物。



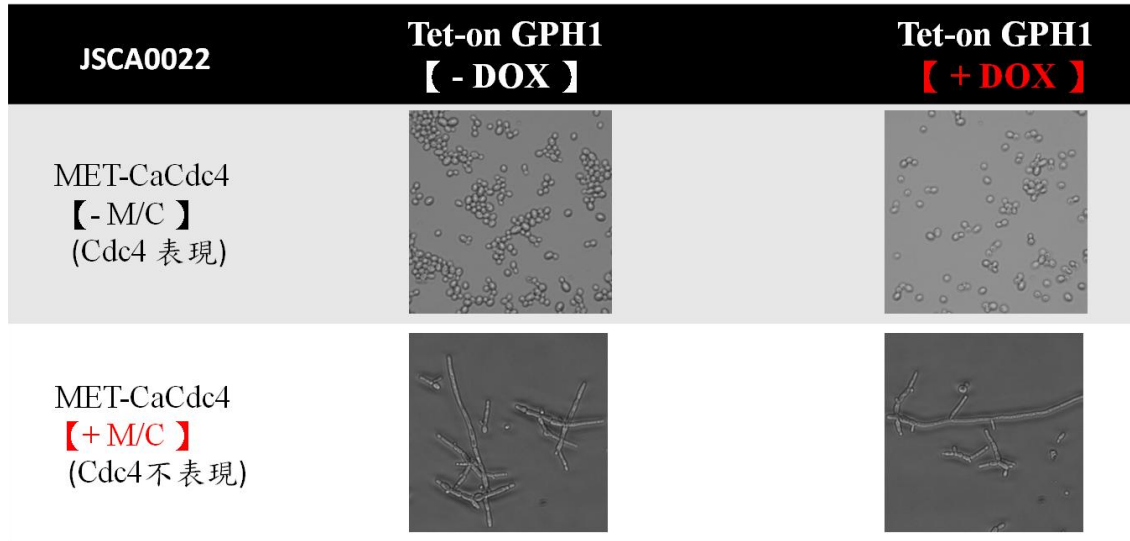
圖二 基因結構。以電穿孔利用同源互換的原理送入以營養缺乏菌株為親本剔除一條 *CaCDC4* 對偶基因，另一條則置於 *MET3* promoter 調控之 *JSCA0022* 菌株中。



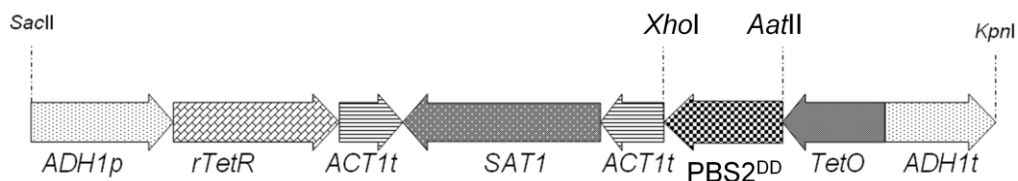
圖三 挑取 Yeast colony 加入 0.1% NaOH(25 mM) 於 95°C 作用 15min 後離心，取接近 pellet 的液體作為 template 以 pNIM1\_inteF 和 pNIM1\_inteR 進行 PCR，初步確認所挑選 colony 結構皆符合預期。



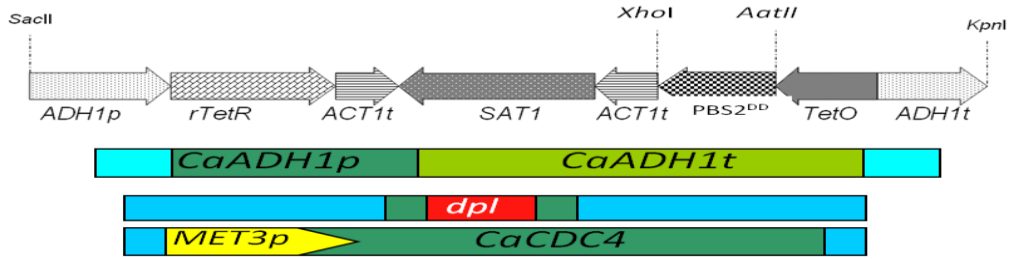
圖四 以 Western blotting analysis 的方式確認菌株在蛋白質表現層次加入 doxycycline 誘導相較於未加入 doxycycline 誘導有較多 *CaGPH1* 的表現量。因 tet GPH1 後帶有 Flag-tag，利用 anti - Flag 抗體偵測。



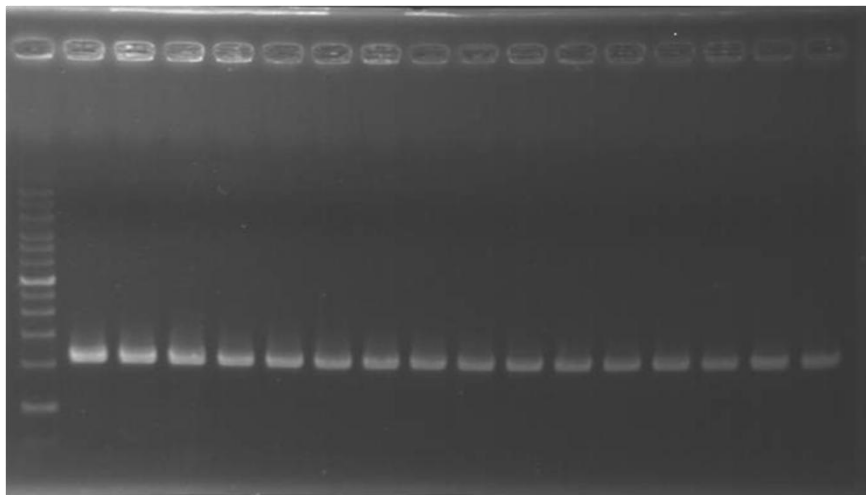
圖五 四環黴素基因調控系統在具有 doxycycline 的情況下會開啟，可大量表現 *CaGPH1*，而 MET3 promoter 在環境中含有 2 mM methionine 甲硫胺酸、cysteine 半胱氨酸的情況下被關閉，並未看到大量表現 *GPH1* 對於菌株型態造成明顯差異。JSCA0022 生長於 SD + Ura + Arg + His medium。



圖六 以 PCR 的方式建構出帶有突變可表現過度活化的  $PBS2^{DD}$  片段，並將此基因片段利用限制酶位點置入四環黴素基因調控系統之質體。此帶有  $CaPBS2^{DD}$  的四環黴素基因調控系統之質體。帶有  $CaPBS2^{DD}$  的四環黴素基因調控系統的 Cassette 上，*SAT1* 的產物能幫助細胞抵抗 nourseothricin (nou.) 抗真菌藥物。

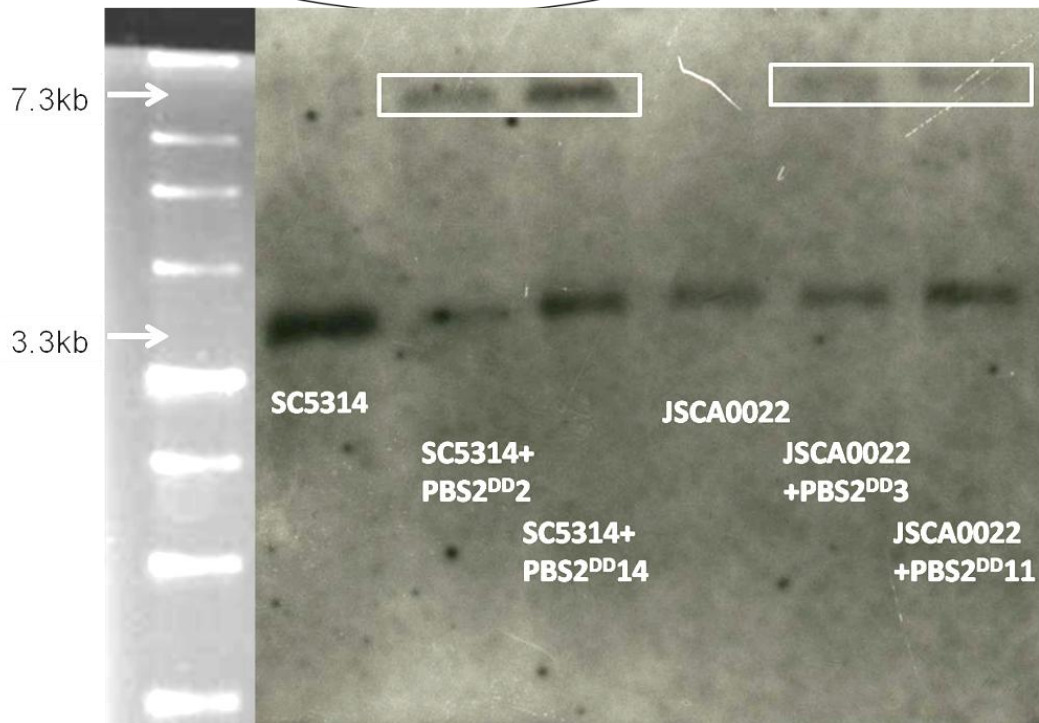
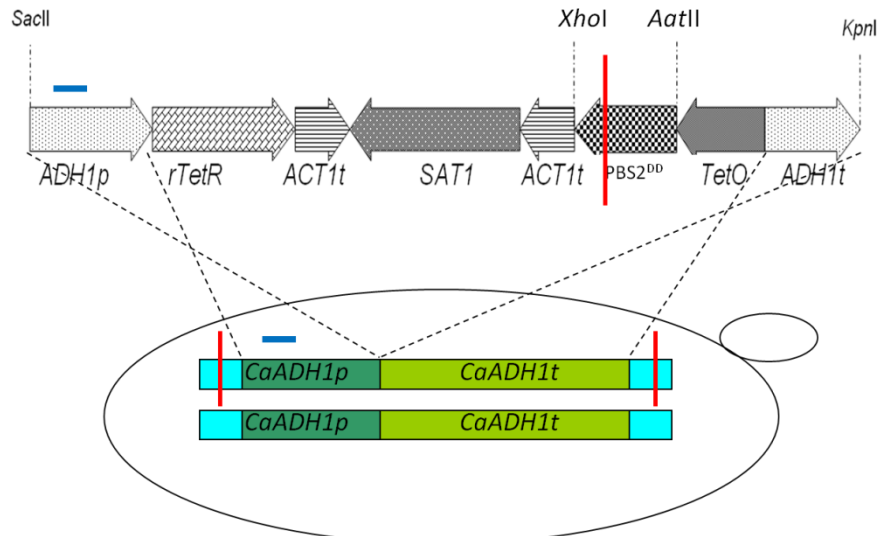


圖七 基因結構。以電穿孔利用同源互換的原理送入以營養缺乏菌株為親本剔除一條 *CaCDC4* 對偶基因，另一條則置於 *MET3* promoter 調控之 *JSCA0022* 菌株中。

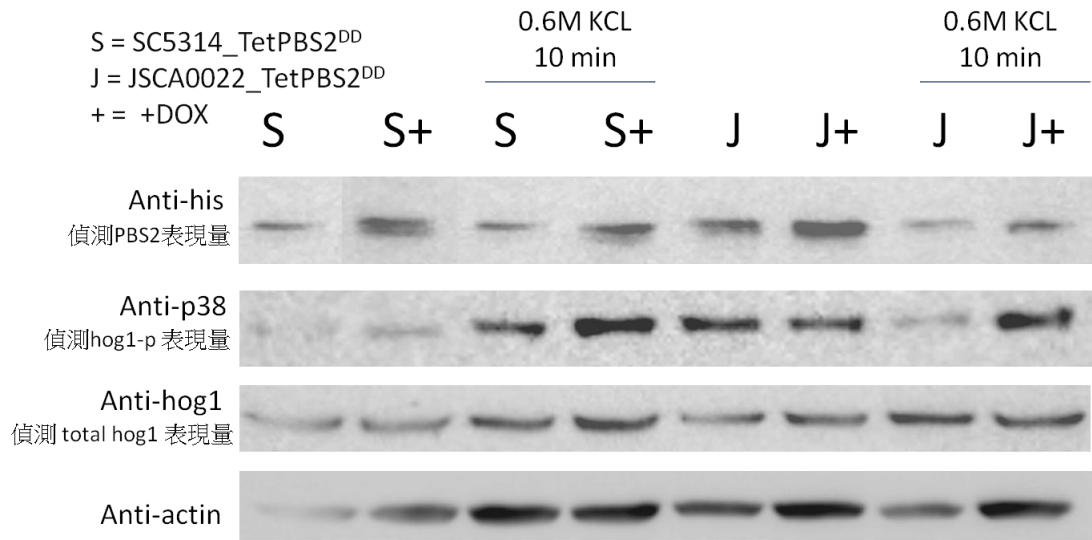


圖八 挑取 Yeast colony 加入 0.1% NaOH (25 mM) 於 95°C 作用 15min 後離心，取接近 pellet 的液體作為 template 以 pNIM1\_inteF 和 pNIM1\_inteR 進行 PCR，初步確認所挑選 colony 結構皆符合預期。

- Probe  $\approx$  500bp
  - 酵素切：*speI*
- (有cassette含probe片段約7.3kb  
無cassette含probe片段約3.3kb)

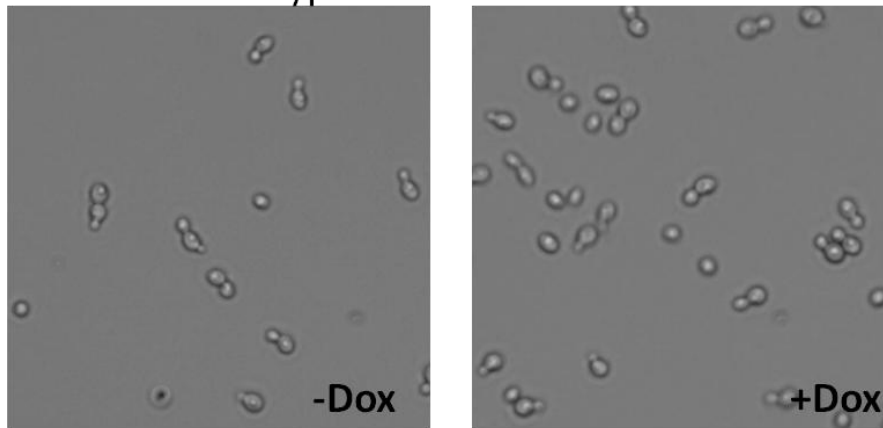


圖九 以 Southern 確認 genome DNA 結構，結果符合預期。

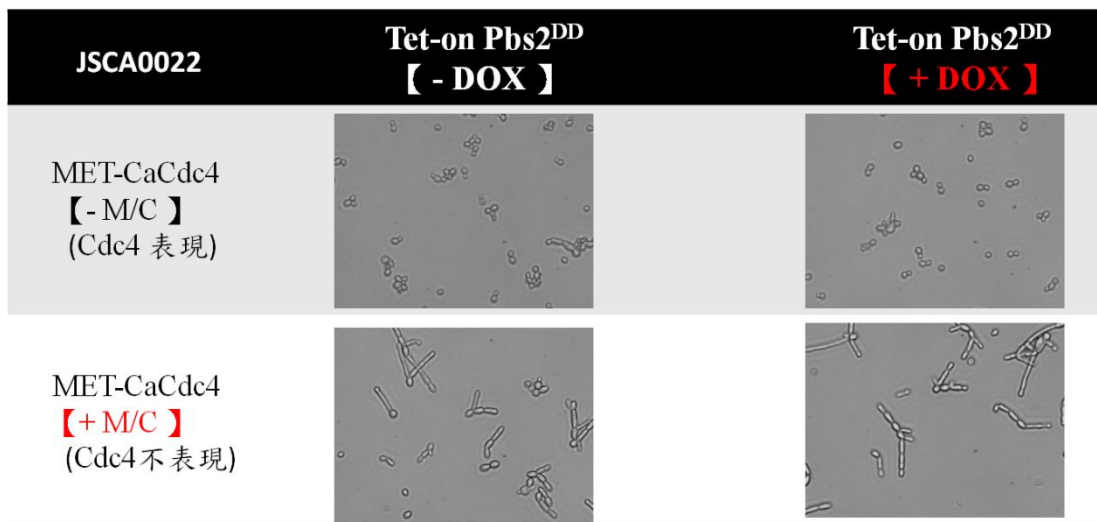


圖十以 Western blotting analysis 的方式確認菌株在蛋白質表現層次加入 doxycycline 誘導相較於未加入 doxycycline 誘導有較多過度活化的  $PBS2^{DD}$  的表現量。另外，由於  $PBS2^{DD}$  為 HOG pathway 的一員，因此另外以已知可誘導 HOG pathway 之環境壓力處理樣品，並進一步以 Western blotting analysis 偵測  $PBS2^{DD}$  之下游蛋白是否有被成功誘導進而保持持續活化狀態。由結果顯示，以 tet-on system 使  $PBS2^{DD}$  表現並不足以使下游 Hog1 持續保持活化。

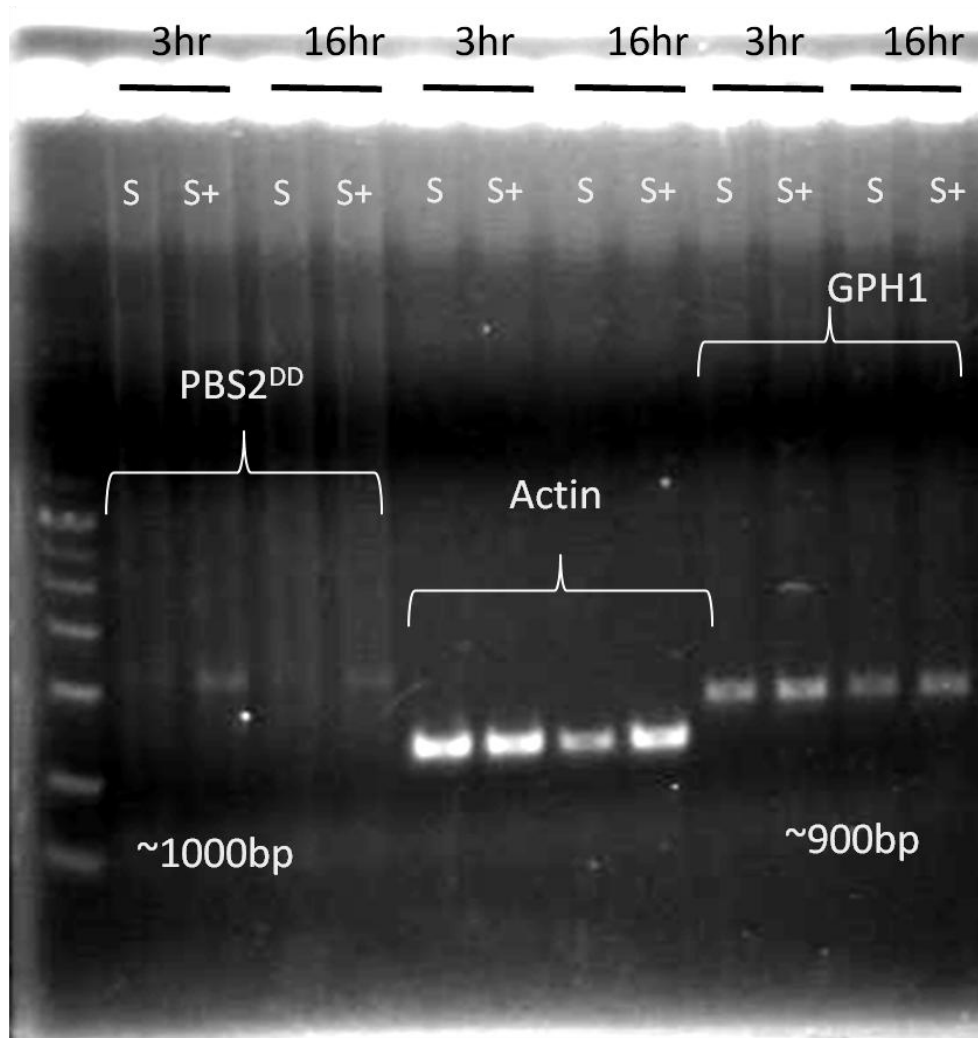
Wild-type with the Tet-on *PBS2<sup>DD</sup>*



圖十之一 YPD medium 加入 doxycycline(Dox)於 30°C 誘導三小時。型態並無明顯差異。

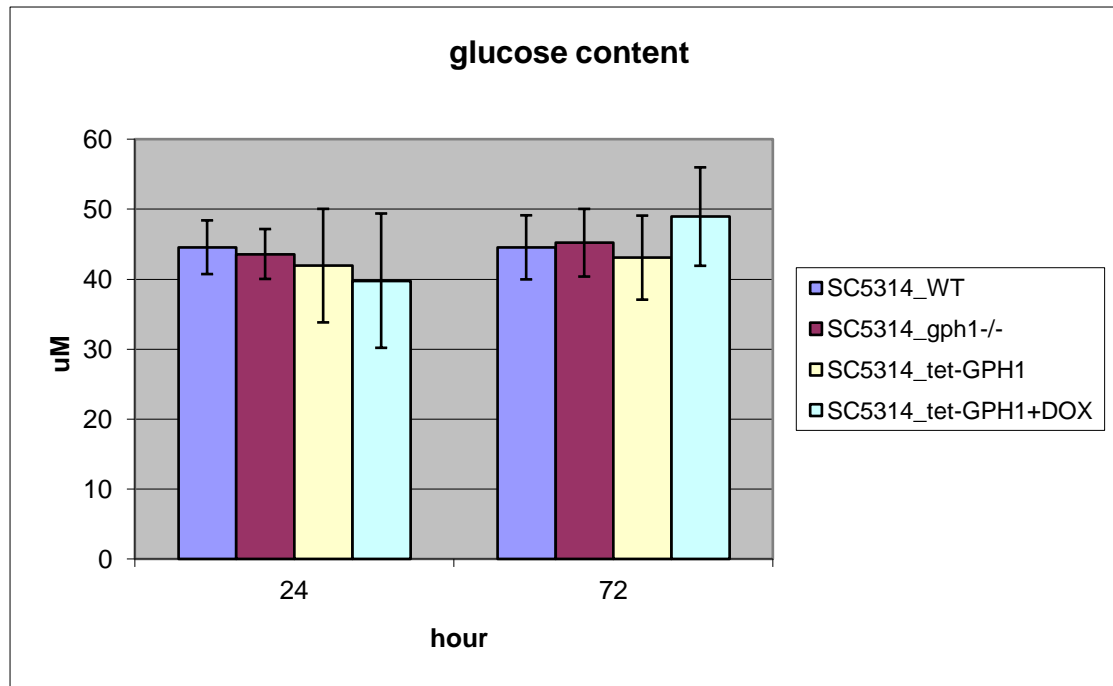


圖十之二 四環黴素基因調控系統在具有 doxycycline 的情況下會開啟，可大量表現 *PBS2<sup>DD</sup>*，而 MET3 promoter 在環境中含有 2 mM methionine 甲硫胺酸、cysteine 半胱安酸的情況下被關閉，並未看到大量表現 *PBS2<sup>DD</sup>* 對於菌株型態造成明顯差異。*JSCA0022* 生長於 SD + Ura + Arg + His medium 。



圖十一 S (SC5314\_Tet  $PBS2^{DD}$ )、S+(SC5314\_Tet  $PBS2^{DD}$  + doxycycline)於 YPD medium 生長。RT-PCR 的結果顯示， $PBS2^{DD}$  表現量上升於 RNA 的層次並未促使 *GPH1* 的表現量有明顯變化。





圖十二 參照文獻的方式，分別偵測野生型 *SC5314*，實驗室以建構完成之剔除 *CaGPH1* 兩條對偶基因 *CaGPH1*<sup>-/-</sup>，實驗室已建構完成之 Tet-on *CaGPH1* 於野生型 *SC5314*，此三種菌株。其中，Tet-on *CaGPH1* 分為加入 doxycycline 誘導組以及沒有加入 doxycycline 的控制組。Glucose assay kit 會偵測到從肝醣水解而來的 glucose-1-P，可間接得知菌株內肝醣累積量。菌株間的肝醣累積量並無顯著差異。

# Reference

- Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004).** The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* *12*, 317-324.
- Santos, M.A., and Tuite, M.F. (1995).** The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* *23*, 1481-1486.
- Barchiesi, F., Schimizzi, A.M., Caselli, F., Novelli, A., Fallani, S., Giannini, D., Arzeni, D., Di Cesare, S., Di Francesco, L.F., Fortuna, M., et al. (2000).** Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* *44*, 2435-2441.
- Beck-Sague, C., and Jarvis, W.R. (1993).** Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* *167*, 1247-1251.
- Cheng, M.F., Yang, Y.L., Yao, T.J., Lin, C.Y., Liu, J.S., Tang, R.B., Yu, K.W., Fan, Y.H., Hsieh, K.S., Ho, M., et al. (2005).** Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. *BMC Infect Dis* *5*, 22.
- Fridkin, S.K., and Jarvis, W.R. (1996).** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* *9*, 499-511.
- 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.
- Noble, S.M., French, S., Kohn, L.A., Chen, V., and Johnson, A.D. (2010).** Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet* *42*, 590-598.
- Oberholzer, U., Iouk, T.L., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2004).** Functional characterization of myosin I tail regions in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* *3*, 1272-1286.
- Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004).** *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* *7*, 350-357.
- Tseng, T.L., Lai, W.C., Jian, T., Li, C., Sun, H.F., Way, T.D., and Shieh, J.C. (2010).** Affinity purification of *Candida albicans* CaCdc4-associated proteins reveals the presence of novel proteins involved in morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* *395*, 152-157.
- Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., and Calderone, R. (2003).** *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative

stress. *Eukaryot Cell* 2, 1018-1024.

**Favre, C., Aguilar, P.S., and Carrillo, M.C. (2008).** Oxidative stress and chronological aging in glycogen-phosphorylase-deleted yeast. *Free Radic Biol Med* 45, 1446-1456.

**Sunnarborg, S.W., Miller, S.P., Unnikrishnan, I., LaPorte, D.C.(2001).** Expression of the yeast glycogen phosphorylase gene is regulated by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway. *Yeast* 18, 1505-14 .

**Vendrell, A., Martínez-Pastor, M., González-Novo, A., Pascual-Ahuir, A., Sinclair, D.A., Proft, M., Posas, F.(2011).** Sir2 histone deacetylase prevents programmed cell death caused by sustained activation of the Hog1 stress-activated protein kinase. *EMBO Rep.* 12 ,1062-1068

**Cheetham, J., MacCallum, D.M., Doris, K.S., da Silva Dantas, A., Scorfield, S., Odds, F., Smith, D.A., Quinn, J.(2011).** MAPKKK-independent regulation of the Hog1 stress-activated protein kinase in *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 286 ,42002-42016.

**Usher, J., Bond, U.(2009).** Recombination between Homoeologous Chromosomes of Lager Yeasts Leads to Loss of Function of the Hybrid GPH1 Gene *Appl Environ Microbiol.* 75, 4573–4579.

**Payne, M.G., and Kingman, H.E. (1947).** Carotene blood levels and reproductive performance in range Hereford cattle. *J Anim Sci* 6, 50-55.

**Shieh, J.C., White, A., Cheng, Y.C., and Rosamond, J. (2005).** Identification and functional characterization of *Candida albicans* CDC4. *J Biomed Sci* 12, 913-924.